

VITAMINE C
ET
RÉPARATION DES FRACTURES OSSEUSES
(RECHERCHES EXPÉRIMENTALES)

THÈSE
PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE
Le Novembre 1941

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Raphaële MARTIN-POGGI

née le 9 avril 1915, à Alger (Algérie).

Examineurs
de la Thèse

MM. ROCHE, *Professeur*, Président,
CHEVALLIER, *Professeur*,
MALMÉJAC, *Professeur*,
M. DOR, *Agrégé*.

} *Asseseurs*

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1941

MARTIN-POGGI (Raphaële)

Vitamine C et réparation des fractures osseuses (Recherches expérimentales). Lons-le-Saunier, Declume, 1941, in 8° raisin, 84 pages.

Thèse de Pharmacie, Marseille,
1941, n°

MARTIN-POGGI (Raphaële)

Vitamine C et réparation des fractures osseuses (Recherches expérimentales). Lons-le-Saunier, Declume, 1941, in 8° raisin, 84 pages.

Thèse de Pharmacie, Marseille,
1941, n°

MARTIN-POGGI (Raphaële)

Vitamine C et réparation des fractures osseuses (Recherches expérimentales). Lons-le-Saunier, Declume, 1941, in 8° raisin, 84 pages.

Thèse de Pharmacie, Marseille,
1941, n°

MARTIN-POGGI (Raphaële)

Vitamine C et réparation des fractures osseuses (Recherches expérimentales). Lons-le-Saunier, Declume, 1941, in 8° raisin, 84 pages.

Thèse de Pharmacie, Marseille,
1941, n°

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

—
1941



PERSONNEL DE LA FACULTÉ MIXTE

DE

MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : Lucien CORNIL

Assesseur : F. MERCIER

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MOITESSIER, CASSOUTE

Chargés de cours honoraires : TIAN, BRUN.

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : Mme PEROT.

Professeurs :

Anatomie.....	CORSY
Anatomie pathologique et Pathologie expérimentale.....	CORNIL
Bactériologie	ROUSLACROIX
Chimie analytique et hydrologie	RIMATTEI
Chimie médicale... ..	ROCHE
Clinique chirurgicale	FIOLLE
Clinique chirurgicale	BOURDE
Clinique exotique	HECKENROTII
Clinique des maladies nerveuses	ROGER
Clinique médicale.....	AUDIBERT
Clinique médicale.. ..	MONGES
Clinique médicale	MATTEI
Clinique médicale infantile	GIRAUD
Clinique obstétricale	VAYSSIÈRE
Clinique ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique.....	BREMOND
Clinique urologique.....	CHAUVIN
Histoire naturelle.....	GABRIEL
Histologie.....	ROMIEU
Hygiène générale et coloniale	VIOLLE
Médecine légale	MOSINGER
Parasitologie	JOYEUX
Pathologie chirurgicale.....	MOIROUD
Pathologie interne	POINSO
Pharmacodynamie et matière médicale	MERCIER
Pharmacie.....	VIGNOLI
Physiologie	MAIMÉJAC
Physique.....	CHEVALLIER
Stomatologie (Professeur sans chaire)	BELTRAMI

Chargé de cours :

Clinique dermatologique VIGNE

Agrégés en exercice :

MM. PIÉRI

CARCASSONNE

BERTHIER

DUBOULOZ

SAUTET

BALANSARD

MM. BRAHIC

FIGARELLA

PAILLAS

ARNOUX

DELPHAUT

MM. IMBERT

AUDIER

CHOSSON

DOR

RECORDIER

Agrégé libre :

M. QUINTARET

Chargé des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale..... DERRIEN

Chargés de Cours complémentaires :

Anatomie descriptive et topographique SALMON

Médecine du travail..... PERIOT

Psychiatrie..... ALLIEZ

Toxicologie GUILLOT

Chimie organique..... DERRIEN

Chimie biologique DUMAZERT

A MON PÈRE ET A MA MÈRE.

*Je dédie affectueusement ce travail,
faible témoignage de toute ma reconnaissance et de ma profonde tendresse
filiale.*

A MON MARI.

Avec toute mon affection.

A MON MAÎTRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN ROCHE.

DIRECTEUR DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE COMPARÉE
DE L'ÉCOLE DES HAUTES-ÉTUDES.

Ma reconnaissance et mon respect.

A MON JURY DE THÈSE.

A MON AMIE MARTHE MOUTTE.

*qui m'a aidée dans l'accomplissement
de ce travail.*

A MES CAMARADES
DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE.
ET A TOUS MES AMIS.

INTRODUCTION.

Le rôle de l'acide ascorbique ou vitamine C dans la physiologie du squelette a depuis longtemps été mis en évidence par le fait que les scorbutiques présentent une fragilité osseuse pouvant aller jusqu'à la fracture spontanée de certaines pièces squelettiques. Toutefois les modalités avec lesquelles s'exerce ce rôle nous échappent encore. Aussi est-il difficile de préciser comment l'acide ascorbique participe à l'ossification et, a fortiori, s'il peut ou non favoriser les réparations osseuses après fracture. Nous nous sommes proposés d'entreprendre des recherches à ce sujet.

Avant d'en aborder l'exposé nous avons pensé qu'il convient de résumer nos connaissances sur la biochimie de l'acide ascorbique, particulièrement étudiée en France par MOURIQUAND, par GIROUD, par BEZSSONOFF et par leurs collaborateurs, et les travaux antérieurs sur les essais de traitement des fractures par la vitamine C.

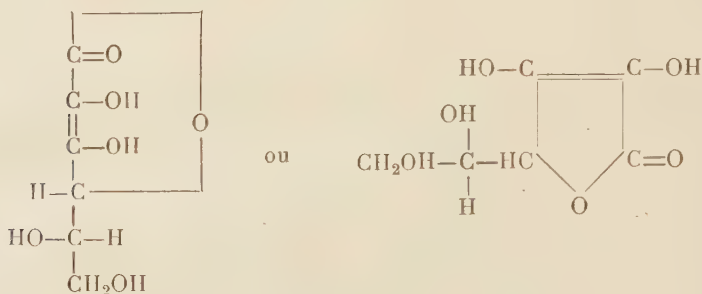
A. — *BIOCHIMIE DE L'ACIDE ASCORBIQUE. CONSTITUTION, PROPRIÉTÉS, RÔLE BIOLOGIQUE GÉNÉRAL.*

I. — *Constitution.*

SZENT-GYÖRGYI a découvert en 1928 dans les capsules surrénales un principe qu'il a isolé à l'état cristallisé. Ayant mis en évidence son caractère glucidique, il lui donna le nom d'acide hexuronique en raison de son analogie avec les acides uroniques (glycuronique, galacturonique, etc...). Réalisant de nouvelles expériences sur des sucres végétaux (jus d'orange, de citron, de chou, de *Capsicum annum* ou paprika) dont les propriétés antiscorbutiques étaient depuis longtemps connues, il constata que la substance présente dans ces sucres et l'acide hexuronique

des capsules surrénales étaient identiques et il lui donna en 1933 le nom d'acide *l*-ascorbique, en raison de son activité biologique.

D'après l'analyse élémentaire, la formule brute de ce corps est : $C_6H_8O_6$. Sa formule développée, établie par HAWORTH et HIRST, par MICHEEL et KRAFTS, est la suivante :



II. — *Propriétés chimiques.*

Doué de propriétés acides, l'acide ascorbique possède deux fonctions alcool et une fonction cétone. Le jus de citron traité par l'acétate de plomb donne une combinaison plombique de l'acide ascorbique, que l'on peut ainsi isoler et purifier. Par évaporation dans le vide du résidu de décomposition du sel de plomb, on obtient l'acide libre à l'état cristallisé. (SZENT-GYÖRGYI et SVIRBELY). TILLMANS, puis IVANOF et HAHN ont préparé de l'acide ascorbique à partir des fruits d'églantier. SCHMIDT et TOULTCHINSKAIA ont mis au point une méthode de préparation de ce corps basée sur l'emploi de solvants volatils, alors que, dans les méthodes précédentes, la défécation plombique entraînait des pertes importantes. Sa synthèse a été réalisée par HARRISSON et HIRST à partir de la xylosone.

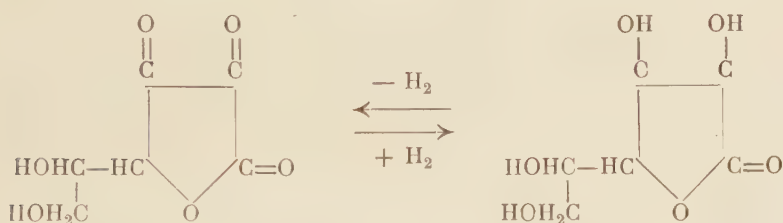
L'acide ascorbique se présente à l'état de cristaux incolores, fondant à la température de 192° . Lévogyre, soluble dans l'eau, l'alcool éthylique dilué, très soluble dans l'alcool méthylique, il est insoluble dans la plupart des solvants organiques. Non adsorbé par la terre à foulon ou l'hydrate de fer colloïdal, il disparaît au cours de la filtration des jus de fruits sur bougie ou charbon de bois. Réducteur énergique grâce au groupement $-\text{C}(\text{OH}) = \text{C}(\text{OH}) - \text{CO}-$, il jouerait un rôle primordial dans les phénomènes d'oxydoréduction intracellulaires,

On le met en évidence par les réactions suivantes :

- 1° Réduction à froid du nitrate d'argent en milieu neutre.
- 2° Réduction du permanganate de potassium en milieu alcalin ou neutre.
- 3° Réduction de la liqueur de Fehling.
- 4° Réduction du 2-6, dichlorophénolindophénol.

SZENT-GYÖRGYI a indiqué une réaction colorée de l'acide ascorbique : si à une solution à 1 p. 100, faiblement alcalinisée, on ajoute un peu de sulfate ferreux il se développe à l'air peu à peu une coloration violette intense grâce à la formation d'un complexe.

L'acide ascorbique ne résiste ni à la chaleur, ni à la dessiccation, en présence d'oxydants. Mais il est stable dans une atmosphère dépourvue d'oxygène. Par oxydation ménagée, il perd deux atomes d'hydrogène et donne l'acide déhydroascorbique $C_6H_6O_6$.



Ce système réversible permet de le considérer comme un transporteur d'hydrogène au même titre que le glutathion. Toutefois l'acide ascorbique subit très facilement une oxydation plus forte, conduisant à la formation de produits irréversiblement oxydés et biologiquement inactifs (BEZSSONOFF et WOLOSZYŃ [2]).

Il existe dans diverses plantes (*Cucurbita maxima*, *Morinda pterygosperma*) une oxydase de l'acide ascorbique. Cette oxydase spécifique, insensible à l'acétone, à l'oxyde de carbone, à la dialyse, inhibée par les cyanures, les alcools éthylique et méthylique, détruite par la chaleur, oxyde plus rapidement l'acide *l*-ascorbique que l'isomère *d*. En dehors de cet enzyme des phénolases peuvent oxyder des phénols (la vanilline par exemple) qui oxydent à leur tour l'acide ascorbique. Enfin, les peroxydases l'oxydent en présence de composés quinoniques additionnés d'eau oxygénée, les quinones étant réduites par

l'acide ascorbique et réoxydées par la combinaison peroxyde-peroxydase, l'acide dehydroascorbique étant à son tour réduit par le glutathion. A ce point de vue, les extraits surrénaux activent l'oxydation de l'acide ascorbique mieux que l'adrénaline.

Des complexes protéine-cuivre peuvent oxyder énergiquement l'acide ascorbique, en dehors de toute action enzymatique (SZENT-GYÖRGYI, VON EULER). Son oxydation spontanée à l'air est catalysée par la présence de traces de métaux (Cu, Fe, Mn, Co), parmi lesquels le cuivre est le plus actif (ETTORI et GRANGAUD [11]).

L'acide ascorbique donne enfin un dérivé acétonique ; régénéré, il conserve ses propriétés vitaminiques.

Telles sont dans l'ensemble, les propriétés de l'acide ascorbique, qu'après de nombreuses expériences, SZENT-GYÖRGYI et SVIRBELY, ZILVA, KING et WAUGH, ont identifié à la vitamine C.

III. — *Méthodes de dosage.*

Son intense pouvoir réducteur est à la base de son dosage, dont les principales modalités sont mises en œuvre dans les méthodes suivantes.

1. **Méthode de BEZSSONOFF.** — L'acide monomolybdophosphotungstique donne en milieu acide et en présence d'acide ascorbique une coloration bleue due à une réaction caractéristique de la fonction diénol, mais non spécifique de celle-ci car elle se produit dans les mêmes conditions en présence d'acide urique.

2. **Méthode de TILLMANS.** — Très simple, elle repose sur le fait que l'acide ascorbique réduit rapidement les indophénols, en particulier le 2-6 dichlorophénolindophénol, qui est son réactif usuel de dosage. Cette méthode peut être mise en œuvre en versant la solution colorée dans celle d'acide ascorbique amenée à $\text{pH} = 2,5-3,0$, jusqu'à virage du réactif du bleu au rose pâle. On peut aussi, comme l'a fait MEUNIER [48] suivre la décoloration en fonction du temps d'une quantité connue de 2-6 dichlorophénolindophénol par une solution d'acide ascorbique à différents pH au moyen d'un photomètre.

3. **Méthode de EMMERIE et VAN EEKELEN.** — Les corps sulfurés de formule générale R-SH (glutathion, cystéine, ergothionéine) qui gênent le virage en réduisant aussi le dichloro-

phénolindophénol, doivent être éliminés des milieux biologiques les contenant. Pour cela EMMERIE et VAN EEKELEN proposent une défécation mercurique suivie d'un traitement à H_2S (demercurisation) et du passage d'un courant d'azote pour chasser H_2S . L'application de la méthode de BEZSSONOF ou de TILLMANS à la solution obtenue permet alors de doser plus spécifiquement l'acide ascorbique. Ce principe a été appliqué par MANCEAU, POLICARD et FERRAND au dosage de la vitamine C dans l'urine [43]. La présence de dérivés sulfhydrylés n'est pas la seule cause d'erreurs parmi celles relevant de la présence dans les milieux biologiques de substances susceptibles d'agir sur le dichlorophénolindophénol. On peut trouver entre autre dans ceux-ci l'acide dioxymaléique, l'acide réductinique, la réductone de von EULER, les sels ferreux combinés à des acides organiques qui tous réduisent le colorant. On peut éliminer la perturbation due aux sels ferreux par le cyanure de potassium en milieu bicarbonaté, et celle due aux dérivés sulfhydrylés par addition d'aldéhyde formique en milieu neutre (GENEVOIS).

4. **Méthode de GENEVOIS, SAG et ESPIL.** — L'acide ascorbique donne une osazone avec la parabromophénylhydrazine. De même on obtient une dinitrophénylhydrazone avec la dinitrophénylhydrazine. GENEVOIS, SAG, et ESPIL, ont appliqué cette propriété à une méthode de dosage de l'acide ascorbique, par précipitation à l'état de dinitrophénylhydrazone, en milieu chlorhydrique 2 N, à chaud, à 50° , ce qui leur permet d'éliminer les erreurs dues aux cétones et aux diénols. Ils opèrent ensuite un fractionnement du précipité en entraînant le dérivé de l'acide ascorbique en solution dans du carbonate de sodium. Pour augmenter la sensibilité de la méthode, on peut titrer la dinitrophénylhydrazone précipitée par réduction au moyen du trichlorure de titane en excès. Celui-ci est dosé en retour par le sulfate ferrique, la fin du virage étant indiquée par le sulfocyanure de potassium. Cette méthode a été appliquée tout récemment par Mlle GATET à l'étude des jus de raisin, orange, citron, et par GENEVOIS, SAG et ESPIL, à celle des extraits aqueux de feuilles d'épinards, de baies d'aubépine, de tubercules et de pousses de pommes de terre.

5. **Méthode de MARTINI et BONSIGNORE.** — Cette méthode de dosage est basée sur la décoloration du bleu de méthylène et

sa transformation en leucobase, en milieu acide, par l'acide ascorbique exposé à une lumière intense. Cette méthode ne paraît pas spécifique. La réductone de VON EULER et les substances voisines renfermant le radical $\text{C}(-\text{OH}) = \text{C}(\text{OH}) - \text{C} = \text{O}$ et qui n'ont pas d'action antiscorbutique, exercent sur le bleu de méthylène, la même action réductrice que l'acide ascorbique. Mais elle ne serait pas influencée par les dérivés sulfhydrilés.

6. **Méthode de CHEVALLIER et CHORON.** — L'acide ascorbique peut en outre être dosé par voie spectrophotométrique grâce aux différences d'absorption ultraviolette de la vitamine et de l'acide déhydroascorbique.

IV. — *Rôle Biologique.*

I. — **Scorbut et carence en acide ascorbique.**

L'acide ascorbique n'est pas moins important au point de vue biologique qu'au point de vue chimique. Si son rôle dans l'organisme n'est pas exactement connu, on sait toutefois que son absence dans l'alimentation de l'Homme et d'animaux ne pouvant en faire la synthèse (Cobaye) amène des troubles dont l'ensemble constitue le scorbut. Le scorbut est une affection connue depuis la plus haute antiquité. HIPPOCRATE décrit une maladie caractérisée par des hémorragies fréquentes et des ulcérations des gencives. PLINE la signale. JOINVILLE en donne une description détaillée et exacte dans le récit des calamités qui frappèrent en Egypte, l'armée de Saint-Louis.

On distingue trois stades dans l'évolution de la maladie (scorbut commençant, scorbut confirmé, scorbut invétéré). Quels en sont les principaux signes caractéristiques ? Dès le début, le malade est très agité ; il souffre de douleurs aux jambes. Par la suite, on note des hémorragies de certains tissus, notamment des muqueuses gingivale et nasale ; les gencives se boursoufflent et saignent au moindre contact, deviennent molles et s'ulcèrent. Les articulations et les extrémités des membres sont douloureuses et enflent. Une diarrhée persistante affaiblit le malade. Des taches bleuâtres, livides, apparaissent sur la peau et l'état général devient mauvais. Les os

deviennent fragiles ; on observe souvent des fractures spontanées. Les dents se déchaussent et tombent. Les hémorragies sont alors de plus en plus fréquentes ; la diarrhée s'accroît. La respiration du malade est pénible et précipitée. La mort peut se produire subitement. C'est ainsi que se manifeste le scorbut chez l'Homme. Il en existe une autre forme, observée chez les enfants, dont les symptômes sont voisins ; elle constitue le scorbut infantile ou maladie de BARLOW (1894).

On a reproduit expérimentalement le scorbut. HÖLST et FRÖHLICH [32, 33] ont établi qu'en nourrissant des Cobayes avec un régime composé de grains de céréales totalement dépourvus de facteur C (avoine, orge), ceux-ci présentent un œdème marqué des articulations, des hémorragies des muqueuses digestives, et meurent au bout de vingt-cinq jours.

Ces expériences ont été reprises à la suite de HÖLST et FRÖHLICH par de nombreux expérimentateurs : COHEN et GIVENS, ZILVA [74], DELF et TOZER [6], MOURIQUAND et MICHEL [53], WEIL et MOURIQUAND [71], Mme RANDOIN et LOPEZ LOMBA [49]. Voici ce que ces derniers ont constaté, en soumettant des Cobayes à un régime scorbutigène :

« Les premiers jours, l'état reste satisfaisant ; vers le 5^e et le 6^e jour, l'animal tourne dans sa cage, réagit vivement quand on cherche à le prendre. On note de la polyurie (COHEN). Entre le 15^e et le 20^e jour, les ingesta augmentent. Les articulations commencent à enfler, d'abord celles des genoux, puis celles des membres antérieurs ; souvent l'animal sous-trait à l'appui le membre le plus douloureux. Au 18^e jour, la diarrhée apparaît, l'état d'excitation fait place à de la torpeur. Il se tient ramassé en boule, le poil hérissé et malpropre. A partir du 20^e jour, ces symptômes s'accroissent, les articulations sont de plus en plus gonflées, les selles fluides deviennent hémorragiques, les pattes se raidissent, les gencives se congestionnent, et les molaires déchaussées se laissent facilement ébranler. On note enfin des fractures spontanées, chez les jeunes principalement, et une chute de la température. La respiration devient difficile. L'animal tombe sur le côté. La mort survient vers le 30^e jour ».

Par addition d'acide ascorbique au régime, ces symptômes disparaissent. Le rôle essentiel de la vitamine C, paraît donc être de protéger l'organisme de toutes ces manifestations. Mais le scorbut expérimental de HÖLST et FRÖHLICH ne re-

produit qu'imparfaitement le scorbut humain. Récemment, MOURIQUAND, EDEL et DAUVERGNE [51] ont réalisé expérimentalement un scorbut subaigu en administrant à des Cobayes une ration insuffisante en acide ascorbique (de 0,5 à 1 mg. par jour). Cet état pathologique se rapproche davantage du scorbut humain, par la longueur de son évolution, l'importance des manifestations hémorragiques, la résistance des troubles digestifs à la médication spécifique.

Le besoin quotidien en vitamine C est de 50 mg. environ chez l'Homme et de 5 mg. chez le Cobaye. Certains animaux (Lapin, Rat) sont insensibles au scorbut, probablement parce qu'ils réalisent la synthèse de l'acide ascorbique dans leurs tissus (ZILVA).

II. — Action métabolique de l'acide ascorbique.

L'acide ascorbique intervient dans de nombreux domaines. Il semble prendre une part active dans tous les échanges qui se font au niveau des éléments constitutifs des tissus (VON EULER). D'après les travaux de SZENT-GYÖRGYI et de HÖJER [31], il ressort que la respiration tissulaire d'un animal carencé, est fortement diminuée. Elle redevient normale par apport d'acide ascorbique. Celui-ci présente la même activité qu'il soit administré sous forme oxydée (dehydroascorbique) ou non (ascorbique), car les tissus réduisent faiblement la première. D'après HARRISON l'adjonction d'acide ascorbique au tissu hépatique d'un animal scorbutique détermine une augmentation de la consommation d'oxygène. L'oxydation de certains acides gras ne se ferait activement au niveau du foie qu'en présence d'acide ascorbique (QUASTEL et WHEATLEY). C'est sur cette action métabolique de l'acide ascorbique qu'on a pu baser des essais thérapeutiques le mettant en œuvre dans le traitement du cancer (ARLOING, MOREL et JOSSE RAND).

Il activerait ou inhiberait l'action de différents enzymes. Les amylases voient leur activité réduite ; au contraire, l'arginase, la papaïne, la catalase, sont activées en présence d'acide ascorbique et de traces de fer ou de cuivre ; en présence de cuivre, l'uréease serait inhibée. Des expériences en cours, au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté Mixte de Médecine et Pharmacie de Marseille sont en faveur de son rôle activateur vis-à-vis de certaines phosphatases.

L'acide ascorbique se trouve à des taux divers dans tous les tissus où sa répartition a été soigneusement étudiée par GIROUD, LEBLOND et RATSIMAMANGA [16], ce qui traduit indirectement son rôle général. Il a une distribution très spécifique et chaque organe, chaque tissu en présente un taux assez caractéristique, comme l'indiquent les données rassemblées ci-dessous.

D'un organe à l'autre les variations sont très grandes. On en trouve dans le système nerveux (substance grise, substance blanche, cervelet, bulbe, nerfs, ganglions spinaux et lymphatiques) dans les milieux oculaires (MÜLLER, KOTAKE, ÅGREN, REISS et NORDMANN, DUMAZERT et PASSELAIGUE) ; dans les glandes endocrines (surrénales, hypophyses, testicules, thyroïde), dans le tube digestif, les reins, le sang, la moelle osseuse, les muscles et en très petite quantité dans les os et les dents.

Voici à ce sujet quelques données empruntées à GIROUD [21].

Teneur moyenne en acide ascorbique (mg. p. 100 g.) des organes chez divers animaux.

Organe	Espèce animale		
	Bœuf	Cobaye	Homme
Surrénale	133	120	20
Hypophyse	126	138	35
Testicule	30	16	—
Corps jaune	114	—	20
Cerveau	16	15	7
Cristallin	26	—	12
Humeur aqueuse	17	—	12
Foie	29	28	7
Pancréas	9	21	4
Poumon	18	—	2
Rate	27	40	15
Glandes lymphatiques	51	50	—
Amygdale	34	—	—
Thymus	65	—	—
Cœur	4	3	2
Rein	10	11	4

Le taux de l'acide ascorbique dans les organes n'est pas constant. Il s'abaisse fortement quand l'Homme ou le Cobaye reçoivent un régime carencé en vitamine et peut atteindre une valeur maxima, témoignant d'une sorte de « saturation » après un certain temps de régime riche en acide ascorbique. Toutefois, la marge d'enrichissement est relativement faible dans la plupart des tissus et l'on n'observe un stockage que dans les organes en général les plus abondamment pourvus, entre

autres les capsules surrénales (DEMOLE ; GIROUD, LEBLOND et RATSIMAMANGA). Ce fait est probablement en relation avec les modalités d'élimination de l'acide ascorbique, lesquelles affectent le rythme suivant.

Quand on administre à un sujet 300 mg. par jour d'acide ascorbique il est rare que celui-ci apparaisse dans l'urine en abondance dès le premier jour de l'expérience. Il faut en général plusieurs jours pour que l'on note une forte vitaminurie. Celle-ci ne porte d'ailleurs que sur une fraction, 15 à 20 p. 100, du produit ingéré et l'on admet alors que l'organisme est saturé en vitamine (DEMOLE, VAN EEKELEN). Divers auteurs (ZILVA, DE CARO, GIROUD, LEBLOND) ont basé sur ce fait un test du degré de « vitaminisation » des organismes, mais il semble que ce ne soit là qu'une appréciation très grossière de celui-ci. En effet, le besoin quotidien de l'Homme en vitamine C est de 50 mg. et l'administration quotidienne de 300 mg. de ce corps chez un sujet normal en bon équilibre conduit à une excrétion dépassant rarement 30-50 mg. d'acide ascorbique. Comme la différence ne se trouve pas dans les tissus, il est probable qu'une partie importante de la vitamine retenue a été détruite dans l'organisme et que seul un « trop plein » apparaît dans l'urine. Dès lors, le test proposé traduirait en même temps le degré de saturation des tissus et la limite de leur capacité d'utilisation métabolique de l'acide ascorbique (BEZSSONOFF, RHOMER et STOERR [3]). Aussi ne convient-il pas de donner un sens très strict à la notion de saturation en acide ascorbique, telle qu'elle est actuellement admise. On verra plus bas (p. 65) le résultat de quelques essais personnels poursuivis à ce sujet.

De toute manière, les organismes détruisent intensément l'acide ascorbique, à partir duquel ils produisent, entre autres, les acides monodéhydroascorbique, dicétogulonique et oxalique. Ces divers corps apparaissent dans l'urine après administration de vitamine C au Cobaye (BEZSSONOFF et WOLOSZYN [3 bis]).

L'acide ascorbique maintient normale la résistance des parois des capillaires sanguins et réglerait leur perméabilité. On lui attribue un rôle dans le fonctionnement de la cortico-surrénale et dans la production de pigments de la peau (Addisonisme). Il semble jouer un rôle actif dans le métabolisme du cristallin où il maintiendrait un certain potentiel d'oxydo-

réduction (REISS et NORDMANN [60]). Il interviendrait dans les processus d'oxydo-réduction cellulaire. Il agirait sur l'hématopoïèse et sur le métabolisme du fer (VOGT et MOURIQUAND). D'après FISH et HARRIS, il serait nécessaire à la formation et à la conservation des dents, suivant un mécanisme que nous étudierons plus bas.

En résumé, on voit que l'absence d'acide ascorbique amènerait dans un organisme des désordres portant sur le sang, les os, les dents, sur tous les tissus en général, et de ce fait, on peut prévoir qu'il doit jouer un rôle très actif dans la formation de la « trame » de tous ces organes, à savoir, la formation et le développement conjonctif.

III. — Action sur le développement du tissu conjonctif.

Déjà en 1926, dans un travail fondamental, WOLBACH et HOWE [73] ont constaté qu'au cours de la cicatrisation des lésions musculaires chez des Cobayes scorbutiques, les fibres conjonctives ne se forment pas. Lors de l'adjonction de jus d'orange au régime, ces fibres commencent à apparaître en 24 heures et les auteurs de conclure que la formation des fibres conjonctives est liée à la présence de vitamine C.

LAUBER, puis JENER et KORPASSY [35] ont également signalé le retard de la cicatrisation des plaies de la peau chez des animaux scorbutiques et ils l'ont attribué au fait que les fibres collagènes se forment de plus en plus difficilement et tardivement. D'autres auteurs, tels PERROCINTO [55], SAÏTTA, LANMANN et INGALLS, HANKE [24, 25] ont noté également un ralentissement dans le processus de cicatrisation. La cicatrice n'est plus suffisamment vascularisée et ceci tient à l'insuffisance de production de fibres conjonctives.

En 1933, MAZOUÉ et RANDOIN [47] reprenant les expériences de WOLBACH et HOWE sur des séries d'animaux normaux ou atteints de scorbut aigu, ont noté l'influence retardatrice de l'avitaminose C sur la formation des granulomes. Pour aboutir à la néoformation du tissu conjonctif fibreux, ces auteurs ont provoqué des réactions inflammatoires du péritoine ; ils ont noté l'apparition de fibres conjonctives au niveau de gaines et de travées au quatrième jour chez les animaux normaux, et seulement au neuvième ou dixième jour chez les scorbutiques aigus. Trois jours après avoir ajouté

au régime du jus de citron frais, les fibres se présentent en abondance. La formation de fibres conjonctives au niveau de lésions expérimentales du péritoine apparaît donc comme retardée et diminuée par l'absence de facteur C.

Ayant répété cette expérience sur des Cobayes atteints de scorbut chronique, on confirma la nécessité de la présence d'un certain taux d'acide ascorbique dans les organes pour que les fibres collagène puissent se former. On avait pensé que cette formation de fibres en grand nombre était due à la présence de vitamine C dans le jus de citron. Pour plus de précision et pour éviter les causes d'erreur dues à la constitution complexe du jus de citron, une nouvelle série d'expériences fut reprise sur des Cobayes scorbutiques présentant des granulomes expérimentaux. Ces Cobayes recevaient une dose journalière de 20 mg. d'acide ascorbique pur en solution dans l'eau. Les animaux sacrifiés montrèrent au bout de 24 heures, de grosses et courtes masses de collagène néoformé et après 48 heures une gaine externe de fibres fines et flexueuses.

Il est donc certain que l'acide ascorbique assure le développement complet du tissu conjonctif et provoque une formation rapide de fibres collagènes au niveau de réactions inflammatoires.

B. — ACIDE ASCORBIQUE ET OSSIFICATION.

L'ossification est un processus très complexe qui aboutit à l'organisation de la substance osseuse, constituant fondamental de l'os (POLICARD et ROCHE [56]). Dans le mécanisme ostéogénétique POLICARD distingue trois phases :

- 1° Augmentation des fibres collagènes du tissu conjonctif.
- 2° Disposition en travées de ce feutrage fibrillaire et imprégnation de substance osseuse.
- 3° Calcification de la substance osseuse.

Avant même d'examiner dans leurs détails les problèmes posés par l'action de l'acide ascorbique sur l'ossification, il apparaît que le mécanisme ostéogénétique doit être en partie sous la dépendance de la vitamine C, puisqu'il comporte en premier lieu la formation de fibres collagènes, laquelle, comme nous venons de le voir, est fortement gênée par le défaut d'acide ascorbique dans les aliments.

On constate chez des animaux soumis à un régime scorbutigène une tuméfaction des articulations chondro-costales et une congestion hémorragique de la moelle osseuse. Les os sont minces et fragiles. Chez les jeunes dans les régions péri-articulaires, il y a séparation de la diaphyse, des épiphyses et celles-ci, réduites à une coque mince et friable, se brisent, au moindre contact. Les lésions osseuses, toujours accompagnées de congestion et d'hémorragies dans la moelle, commencent assez tard et s'exagèrent rapidement. TOZER [68] a spécialement étudié les troubles osseux au niveau des articulations costales chez des animaux carencés. Au point de vue histologique, il n'a pas observé de modifications, dans les premiers jours, mais après, même si la côte demeure d'aspect normal, on note des altérations microscopiques portant sur de légers désordres dans la sériation des cellules cartilagineuses et des trabécules osseuses. Au niveau de l'articulation, l'os moins épais, se trouve fracturé sur l'un des côtés ou sur les deux.

Une avitaminose C expérimentale et partielle, peut amener un syndrome voisin du rhumatisme chronique avec ankylose et inflammation de l'os et du périoste. Une décalcification se produit au niveau des épiphyses et dans les régions métaphysaires ; elle porte surtout sur les os des membres postérieurs : fémur et tibia. MOURIQUAND, DAUVERGNE EDEL [50] ont étudié la décalcification portant sur le col fémoral au cours de l'avitaminose C chronique. Elle peut n'être qu'ébauchée ou s'accroître avec le temps et devenir totale ; mais, alors que généralement des lésions dues au scorbut sont guéries par un traitement spécifique à l'acide ascorbique, tel n'est pas le cas ici et de fortes doses prolongées de vitamines C ne les font pas régresser.

C'est sans doute de l'avitaminose C partielle chronique qu'il relève également des troubles de l'ossification observés par BELTRAMI [1] chez des animaux de ménagerie (éléphants, lions). Cet auteur, étudiant les troubles de l'ossification et de la dentition provoqués par un déséquilibre alimentaire en vitamine C, chez un éléphant du Jardin Zoologique de Marseille, a établi que cet animal nourri de lait bouilli, de riz cuit, et de légumes cuits était mort en présentant une fracture spontanée du tibia et du péroné ; cet éléphant présentait en outre des anomalies dans l'évolution dentaire.

Des travaux récents, ont mis en évidence l'action exercée par l'acide ascorbique sur le système osseux de l'Homme. L'absence de facteur C, amène chez l'enfant ou l'adulte, un arrêt de l'ossification, une ostéoporose généralisée ; ceci serait dû à une modification des cellules cartilagineuses, des ostéoblastes et de la substance fondamentale (HÖJER, ASCHOFF, KOCH, STEPP, GYÖRGYI, MC COLLUM, EDDY, DALLDORF).

Suivant HARRIS [27], l'acide ascorbique aurait une action spécifique de stimulation sur le développement des cellules participant à la structure des organes, notamment des ostéoblastes et des myéloblastes. Les ostéoblastes ne sont plus le siège d'échanges nutritifs normaux et donnent naissance à un os spongieux. Un état d'ostéoporose s'établit progressivement, il se produit une décalcification du tissu osseux qui provient d'un trouble du métabolisme de l'os lui-même.

DJABRI enfin [7] a essayé de préciser par des données quantitatives l'action ostéogénétique de l'acide ascorbique sur des Cobayes carencés. Il a noté l'état de l'os, son aspect, sa résistance et sa composition chimique. Des lots de Cobayes, à savoir : un groupe scorbutique et d'autres recevant des doses quotidiennes croissantes d'acide ascorbique depuis 0 mg.,15 jusqu'à 20 mg. par jour ont été mis en expérience simultanément. Après 30 jours on sacrifie les animaux et on a étudié leurs os.

Les Cobayes qui n'avaient pas reçu d'acide ascorbique présentaient des symptômes nets de scorbut aigu. Les os étaient friables, papyracés, translucides, se brisant facilement entre les doigts. Les épiphyses se séparaient avec facilité des diaphyses. Ces symptômes diminuaient en raison directe de la quantité d'acide ascorbique adjointe au régime, les Cobayes recevant 20 mg. de produit par jour ayant des os fermes et résistants. De plus, ces expériences ont prouvé que la vitamine C administrée aux Cobayes exerce une influence nette sur le poids de l'os et sur sa croissance, la longueur des fémurs des animaux traités avec 5 et 20 mg. étant supérieure de 20 p. 100 à celle des scorbutiques. Au point de vue chimique l'os scorbutique ne diffère pas de l'os hypervitaminosique. Ces constatations viennent confirmer celle de MOREL, MOURIQUAND, MICHEL et THÉVENON [50], de MOURIQUAND, LEULIER et MICHEL [52], contrairement à IWABUCHI (1922), BOUWEL (1927), STATSMANN (1930) qui pensent qu'il y a diminution du calcium et du phosphore dans l'os scorbutique.

Pour SLATER et AUB (1931), le scorbut provoquerait un défaut du dépôt de calcium dans les os. Pour DJABRI, les modifications chimiques qui apparaissent dans le tissu osseux au cours du scorbut expérimental sont négligeables en comparaison des modifications histologiques. La carence en vitamine C, arrête la croissance de l'os et provoque sa résorption ; l'os perd du poids, mais sa composition chimique demeure identique. Chez l'animal carencé, l'administration d'acide ascorbique rétablit la croissance, augmente la masse et la solidité de l'os.

En résumé, l'acide ascorbique exerce une action ostéogénétique indéniable. Il joue le rôle de régulateur physiologique de l'ostéogénèse. Celle-ci est sous la dépendance de la concentration de l'acide ascorbique dans les tissus, laquelle dépend de la quantité de vitamine C ingérée chez les animaux qui n'en réalisent pas la synthèse.

C. — ACIDE ASCORBIQUE ET DENTITION.

Nous venons d'étudier l'action exercée par l'acide ascorbique sur le comportement des os longs et les lésions occasionnées par sa carence. Or toute affection générale portant et sur les réserves osseuses, et sur la substance préosseuse, a son corollaire dans une affection dentaire, et il est impossible de ne pas relier les réactions dentaires aux réactions générales du squelette.

On a noté, en effet, des troubles de la dentition, lors de l'avitaminose C. Nous avons signalé dans la symptomatologie du scorbut des hémorragies au niveau des dents, une ulcération des gencives, le déchaussement et la chute des dents. DALLDORFF et ZALL (1930) ont remarqué que le développement des incisives de Cobayes qui normalement se produit à un rythme constant de 0 mm.,75 par jour diminue puis cesse au cours du scorbut vers le quinzième et vingtième jour. Chez le Cobaye scorbutique, on peut même relever sur les dents des symptômes précoces de scorbut, quand tous les autres signes font encore défaut (ZILVA et WELLS).

H. T. HANKE [24] a noté dans un important travail d'ensemble, les effets des régimes carencés en facteur C sur les tissus de la bouche. Il écrit notamment : « La mâchoire et les os de la face, restent de taille infantile et présentent une ostéoporose étendue chez le jeune Singe élevé avec un régime déficient en

vitamine C. Les dents sont tassées (HOWE). La dentine produite pendant que les animaux sont scorbutiques, est mince, imparfaitement formée et malléable. L'émail peut presque entièrement manquer, ou il est mince et médiocrement calcifié ». Et il ajoute : « une dentition parfaite de l'Homme ne peut pas être obtenue à moins que le régime ne contienne une quantité suffisante de vitamine C ».

HÖJER [31] a insisté également dès 1926 sur les altérations pathologiques qui se produisent dans la structure des dents au cours de l'avitaminose expérimentale. Celle-ci subit des modifications précoces, progressives qui se produisent bien avant les autres modifications scorbutiques. Les odontoblastes disparaissent. La calcification de la prédentine est amorphe et il n'y a pas de canaux dans celle-ci. L'ivoire des dents ou dentine, se fait de plus en plus rare. On note une dilatation des vaisseaux de la pulpe, laquelle présente de l'œdème. SHIBATA a, par ailleurs, signalé des caractères régressifs de l'émail et de la dentine.

Enfin, dans un très important travail, FISH et HARRIS [13] (1934) ont particulièrement étudié les dents de Cobayes atteints de scorbut aigu, subaigu, en évolution ou en voie de guérison. Ils ont élaboré une interprétation nouvelle des anomalies que présente la dentition au cours de cette maladie. Le scorbut amènerait une dégénérescence prématurée des odontoblastes, cementoblastes, améloblastes. D'après eux, l'acide ascorbique maintiendrait normale l'activité fonctionnelle de toutes ces cellules. Cette action de la vitamine C serait primordiale. Les autres manifestations de la carence seraient secondaires et considérées comme des séquelles physiologiques de cette action primitive. Les auteurs se sont attachés plus particulièrement à l'étude des incisives des Cobayes, car celles-ci présentent une croissance continue et, de ce fait, contiennent des cémentoblastes, des améloblastes, des odontoblastes, simultanément à l'état embryonnaire, mûrs et séniles. Quand les odontoblastes dégénèrent physiologiquement ou pathologiquement, ils perdent leurs fibrilles, ce qui va de pair avec la mort de la dentine primaire. La dentine morte est alors normalement fixée par un tissu cicatriciel calcifié, qui remplace la pulpe et emplit l'espace pulpaire ; le tissu formé emprisonne des îlots de débris cellulaires et correspond à la dentine secondaire des dents humaines.

Au cours du scorbut subaigu, une dégénérescence partielle des odontoblastes conduit d'abord à la formation d'une dentine irrégulière, puis, quand ces odontoblastes dégènèrent, la cavité pulpaire se remplit entièrement d'un tissu cicatriciel calcifié, qui correspond à la dentine secondaire normale, renfermant de nombreuses cellules dégénérées ou mortes.

Dans le scorbut aigu, la dégénérescence primitive et la mort de tous les odontoblastes provoquent la mort de la dentine primaire et il ne peut plus alors se former de tissu cicatriciel calcifié. Si toutefois, le scorbut guérit, celui-ci prend naissance et remplace la pulpe dégénérée.

Mais la dentine n'est pas seule à subir des modifications. La dégénérescence prématurée des améloblastes provoque la cessation complète de la production d'émail pendant le scorbut. Si celui-ci guérit, la coupe de l'émail néoformé présente une cicatrice kératinisée déposée sur la cicatrice calcifiée, ce qui traduit l'impossibilité pour la dentine primaire de se développer.

FISH et HARRIS signalent également, que le défaut de formation d'émail, au cours du scorbut, pourrait être à l'origine des caries dentaires. Enfin, la dégénérescence primitive des cémentoblastes, empêche la formation de ciment primaire à la racine de la dent.

D. — ACIDE ASCORBIQUE ET RÉPARATIONS OSSEUSES.

D'après ce qui précède, le rôle de l'acide ascorbique sur le maintien de la structure et de la composition normale des différentes pièces osseuses du squelette est incontestable. Lors de la consolidation d'une fracture, la formation d'un cal, puis l'ossification de celui-ci se succèdent suivant un ordre donné qui reproduit rapidement le processus aboutissant à la formation du tissu osseux au cours de la croissance normale.

On a signalé depuis longtemps, l'influence néfaste du scorbut sur la régénération osseuse. ASTLEY COOPER, dès la fin du XIX^e siècle, puis BIER, ISRAËL et FRANKEL (1925) ont observé que le manque d'aliments frais va de pair avec un défaut de consolidation lequel régresse avec un régime approprié. Leurs observations ont été confirmées dans le domaine expérimental par WATANABE, SCHILOWZEW, JENER et KORPASSY. Néanmoins,

les opinions sur la valeur thérapeutique de la vitamine C dans le traitement des fractures chez des sujets recevant un régime riche en vitamine sont des plus diverses, tandis que l'on admet qu'elle favorise la formation du cal chez des sujets en avitaminose (ISRAËL et FRANKEL [14] ; SCHILOWZEW). En somme l'avitaminose C empêche la formation du cal de fracture, mais l'influence de l'acide ascorbique sur la formation de celui-ci ne peut pas être précisée.

Au point de vue clinique, les résultats obtenus sont imprécis. Pour HANKE, pour SCHILOWZEW, l'acide ascorbique exerce une influence favorable dans tous les cas, pour HALASZ et MARX [23] elle n'exerce aucune action à faible dose et de fortes doses sont nuisibles. Pour BASTER et TRÜCK [70], elle est toujours sans effet.

On a étudié la relation entre l'évolution de la fracture et la rétention de la vitamine C chez des Lapins recevant chaque jour 100 mg. d'acide ascorbique. On note une forte diminution de l'excrétion urinaire au cours de la formation du cal. Donc l'augmentation du besoin en vitamine C, serait importante et parallèle à la formation du cal immédiatement après la fracture (LAUBER, NAFZIGER, BERSIN [37]). Toutefois, le Lapin étant un animal insensible au scorbut, ces résultats, à première vue surprenants, ne peuvent pas être interprétés sans réserves. D'après TRÜCK [70], si on administre quotidiennement à l'Homme 300 mg. d'acide ascorbique, l'élimination augmente après 5 à 6 jours, atteignant parfois jusqu'à 50 p. 100 de la dose administrée. Lors des fractures, l'élimination est identique à celle que l'on observe chez des sujets normaux et l'on n'observe une « augmentation du besoin », en fait une diminution de l'excrétion, qu'au cours d'infections aiguës et de longue durée. Les résultats de TRÜCK et ceux de LAUBER, NAFZIGER et BERSIN sont donc en opposition formelle.

Au point de vue expérimental, les données obtenues sont également imprécises. Les recherches à citer sont assez nombreuses, mais leurs résultats sont contradictoires, peut être en raison du choix du Lapin, animal non carencable, comme animal d'expérience par certains auteurs.

Pour HANKE [24, 25] la vitamine C améliore les fractures dans tous les cas, et possède une « action extraordinairement importante » sur la formation du cal. En ajoutant quotidiennement de la vitamine C au régime de Cobayes porteurs d'une

fracture, les résultats sont dans l'ensemble satisfaisants. Chez le Lapin avec régime sans vitamine C, on note une simple amélioration de la réparation, le Lapin synthétisant cette substance.

HANKE a noté également, chez le Cobaye scorbutique, un début de réparation de la fracture, mais le cal ne se forme pas ou bien il se résorbe. Avec un régime scorbutique additionné de vitamine C, on obtient une bonne réparation et cet auteur en déduit qu'il faut administrer de l'acide ascorbique quand il y a avitaminose ou hypovitaminose.

SCHILOWZEW fait les mêmes constatations chez l'animal et chez l'Homme et note une action favorable de l'acide ascorbique dans la régénération osseuse. Par contre, LAUBER parle d'une action nocive de fortes doses d'acide ascorbique, les faibles doses n'ayant aucune action sur la répartition des fractures.

GIANGRASSO et GARGITANO [17] abondent dans ce sens, et pensent que l'administration de fortes doses de vitamine C, de l'ordre de 50 à 100 mg., à un Lapin présentant une fracture radiale, exerce une action nocive principalement dans la première période d'évolution du cal, du 10^e au 15^e jour. Cette action deviendrait moins marquée par la suite, mais le dépôt des sels de calcium demeurerait déficient. La mise en évidence de la formation de quantités importantes d'acide oxalique aux dépens de la vitamine C explique peut-être ce fait.

HALASZ et MARX [23] aboutissent aux mêmes conclusions. Leur étude radiographique et histologique a porté sur le cal de Cobayes ayant reçu un régime complet ou additionné d'une quantité suffisante de jus de citron ou d'acide ascorbique. Au bout de 6 semaines, le résultat de l'examen des animaux soumis à l'un ou à l'autre régime ne montrait aucune différence. Cette expérience cependant, ne peut être concluante, le régime des animaux témoins n'ayant pas été carencé en vitamine C.

Mais des études plus précises et plus récentes de HERTZ et LEXER sont venues confirmer les hypothèses de HANKE. Pour HERTZ [29] chez le Cobaye scorbutique la réaction primitive inflammatoire consécutive à la fracture est retardée par rapport à la normale. Il y a défaut net de collagène dans le tissu conjonctif et le tissu ostéoïde néoformé et un défaut de

formation du tissu ostéoïde. Les travées ostéoïdes néoformées se calcifient néanmoins très vite, et plus fortement que chez les témoins normaux. Le cal ne renferme pas de cartilage ; comme dernière étape, on observe fréquemment un pseudarthrose ce qu'avaient noté déjà ISRAËL et FRANKEL. Il y a un retard net dans la consolidation des fractures chez le Cobaye carencé.

Les recherches de LEXER [41, 42] ont surtout porté sur la vascularisation du foyer de fracture. On avait remarqué que chez les scorbutiques, la réaction vasculaire périostique était insuffisante et que les vaisseaux avaient une résistance anormalement faible. Pour LEXER, à l'état normal, le cal commence à se vasculariser six jours après la fracture ; la vascularisation augmente jusque vers le douzième jour, puis diminue ; au quatorzième jour le cal de fracture est fasciculé, et l'ossification se fait du vingt-sixième au vingt-neuvième jour. Or, au cours de la carence, il y a un défaut net de vascularisation du cal. Celle-ci augmente progressivement, mais n'atteint jamais la normale et de nombreux foyers hémorragiques apparaissent dans la zone du cal. Par un régime approprié en vitamine C, il y aurait rétablissement de l'état normal. Au point de vue histologique, on note chez les animaux normaux la formation d'un cal cartilagineux dès le sixième jour et sa transformation en os de membrane dès le quatorzième jour. Chez les carencés, il y aurait début de formation de cal cartilagineux et fibreux mais celui-ci s'atrophierait et se résorberait.

D'autres expériences sont en faveur d'une action positive de l'acide ascorbique dans la régénération osseuse. La vitamine C activerait la consolidation des fractures d'après TRINTIGNAC [69]. HEMMINGER [28] observe la même accélération chez le Chien. D'après GIANGRASSO [17, 19] l'acide ascorbique favoriserait la réparation des fractures chez l'Homme. Il y aurait raccourcissement du temps de consolidation, la prolifération des éléments réticulo-histocytaires étant beaucoup plus marquée dans les zones de l'os adjacentes au foyer de fracture quand les animaux ont été traités par la vitamine C. Administrée à dose optima, elle ferait évoluer le cal en un temps moindre que celui noté chez les animaux témoins.

GIANGRASSO a, par ailleurs observé [19] chez des rats que l'ablation des parathyroïdes empêche la formation du cal,

tandis que celle-ci a lieu si on administre de la vitamine C aux animaux. La réparation osseuse est d'autant meilleure que la dose administrée est plus élevée, mais elle n'atteint alors en aucun cas, la vitesse de réparation obtenue chez les témoins normaux. Dans le traitement de fractures difficiles à consolider, il y aurait gain de moitié du temps de réparation. Par contre, pour TRÜCK (1937), l'acide ascorbique ne joue aucun rôle dans les réparations osseuses. Un ensemble de documents cliniques recueillis dans le service de TRÜCK par son élève BASTER montre que cliniquement l'on n'observe pas le plus petit résultat favorable par administration de vitamine C aux fracturés, dont il serait par ailleurs aussi facile d'obtenir la saturation en acide ascorbique que celle des sujets normaux.

Mais toutes ces expériences n'ont eu qu'un contrôle radiographique ou histologique et l'expérimentation en elle-même est réduite. Il n'existe pas de documents chimiques sur ce sujet à notre connaissance. Il ressort néanmoins des travaux que nous venons d'analyser que l'acide ascorbique semble jouer un rôle actif au cours de la régénération osseuse et c'est ce qui nous a poussés à entreprendre un ensemble de recherches sur ce problème. Nous avons en effet pensé que les contradictions ou les imprécisions gênant l'interprétation des résultats antérieurs tenaient aux conditions d'observation dans lesquelles s'étaient placés les auteurs et qu'il devait être possible de mettre en évidence le rôle de la vitamine C dans les réparations osseuses par les expériences que nous nous proposons de faire.

E. — *OBJET DU TRAVAIL.*

Les travaux entrepris dans le but de mettre en évidence l'action de l'acide ascorbique sur l'ossification et la réparation des fractures sont, comme nous venons de le voir, nombreux, tant au point de vue clinique, qu'au point de vue histologique. Mais leurs résultats sont souvent imprécis, voire même contradictoires. Tous les auteurs sont d'accord pour admettre la fragilité osseuse des scorbutiques, et pour constater un retard à la consolidation chez les sujets en avitaminose ou en hypovitaminose C. La plupart attribuent à l'acide ascorbique un rôle fondamental dans la cicatrisation osseuse ; mais il n'existe aucun document chimique sur ce sujet.

Nous avons repris l'étude de cette question et avons essayé de préciser par des moyens et des méthodes biochimiques la participation de l'acide ascorbique aux réparations osseuses et à l'ossification.

Nous avons d'abord étudié la composition chimique des os de différents lots de Cobayes, normaux, scorbutiques, fracturés, carencés ou non en vitamine C, afin de mettre en évidence les modifications éventuelles en relation avec la carence en acide ascorbique.

Nous avons ensuite essayé de préciser le mécanisme d'action, la localisation et la répartition de la vitamine C dans les différentes parties de l'os fracturé pendant l'évolution de la lésion. Parallèlement, nous avons suivi le développement de l'activité phosphatasique des os au cours du scorbut et pendant la formation du cal chez des animaux normaux ou scorbutiques.

Nous espérons déterminer ainsi un ensemble de données permettant de préciser le rôle de la vitamine C dans l'ossification de réparation et de comprendre le mécanisme d'action de ce corps. Les résultats obtenus nous ayant montré la participation de l'acide ascorbique à la formation du cal, nous avons envisagé de les appliquer à la thérapeutique des fractures, grâce à l'obligeance de M. le Professeur Agrégé J. Dor, qui a bien voulu nous associer à ses recherches. Les expériences commencées au début de l'année 1941 sont actuellement en cours, et leurs résultats ne figurent pas dans notre travail.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Presque tous les travaux se proposant d'étudier le rôle de l'acide ascorbique dans l'ossification sont d'ordre histologique, anatomique, ou clinique ; les documents chimiques sont rares et incomplets. Aussi avons nous été amenés à entreprendre une série de recherches préliminaires avant d'aborder le principal sujet de nos expériences, à savoir : l'action de la vitamine C sur l'évolution des fractures osseuses.

A. — *PLAN GÉNÉRAL DES EXPÉRIENCES.*

Nous nous sommes proposés d'étudier l'ossification dans des conditions diverses en nous basant sur des documents de deux ordres relatifs, les uns à la composition des os, les autres à leur activité phosphatasique.

Nous avons eu recours, pour nous faire une idée précise du degré de calcification des os, à la détermination du rapport : Phosphore total/Azote total (P/N). Le phosphore étant l'élément représentatif des sels de l'os, et l'azote caractéristique de la matrice protéique, P/N apparaît comme un véritable indice chimique de l'ossification des pièces squelettiques (A. ROCHE et I. GARCIA [61]).

Par ailleurs, les travaux de ROBISON ont établi le rôle joué par une phosphatase dans l'ossification et les recherches de J. ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI ont précisé les étapes de la croissance ou des réparations osseuses au cours desquelles cet enzyme intervient activement. Nous avons pensé qu'il y avait intérêt à étudier l'activité phosphatasique des os dans les diverses conditions expérimentales où nous désirions nous placer

— et cela tant sur des pièces squelettiques fracturées (diaphyse) que sur des cals. Tels sont les moyens d'expérimentation que nous avons choisis.

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié le rapport : P/N et l'activité phosphatasique des os de Cobayes normaux de poids divers, afin de pouvoir comparer les caractères des pièces osseuses, normales ou non, à toutes les périodes de la croissance.

Dans une deuxième série, nous avons étudié le scorbut en évolution chez des animaux à squelette intact.

Les animaux fracturés, soumis à un régime alimentaire complet, ont fait l'objet d'une troisième série d'expériences. Pensant à la possibilité d'un rôle local de l'acide ascorbique dans la formation et l'évolution du cal, nous avons étudié la teneur de celui-ci et des diverses pièces squelettiques (os et dents) en vitamine C et déterminé par ailleurs leur activité phosphatasique aux divers temps de la réparation. Enfin, notre expérimentation a porté sur les os de Cobayes fracturés, scorbutiques ou non, traités par l'acide ascorbique administré à doses diverses.

B. — TECHNIQUES.

1. Régimes et conditions de vie des animaux. *Préparation des os.*

Les différentes valeurs de l'indice de calcification P/N ont été jusqu'à présent établies sur des Pigeons (J. ROCHE et MOURGUE) ou sur des Rats blancs (A. ROCHE et I. GARCIA, J. ROCHE et MARCELET). Etant donné le but de nos recherches, celles-ci devaient nécessairement être poursuivies sur une espèce sensible à la carence en vitamine C. Le Cobaye est à cet égard l'animal le plus indiqué, et nous l'avons systématiquement utilisé.

Sauf dans le cas des animaux normaux, dont le poids oscille entre 50 et 750 grammes, nos recherches ont été poursuivies généralement sur des Cobayes d'un poids moyen de 500 g. soumis à deux catégories de régime :

a. — Régime normal constitué de : pain, herbe, son, avoine, légumes verts (carottes, salades).

b. — Régime scorbutigène composé de pain, foin (sec), avoine et son.

Nous avons pesé journellement les animaux, établi leur courbe de poids, noté l'état de leur vivacité, les altérations de leur démarche et l'apparition des œdèmes articulaires ou des symptômes hémorragiques du scorbut. Cet examen et la courbe de poids nous ont permis de déceler avec précision les manifestations de la carence ou, au contraire, leur disparition. Les animaux ont été sacrifiés après des temps variables, indiqués dans la description de chaque expérience. Nous avons prélevé leur radius droit fracturé (sauf chez les témoins) et son homologue gauche (intact). Les os étant débarrassés des tendons et des muscles qui adhéraient à eux, on sépare à l'aide d'un scapel les épiphyses de la diaphyse. Ils ont ensuite été fendus longitudinalement pour en extraire la moelle, soigneusement grattés et lavés avec une solution isotonique de chlorure de sodium et, enfin on isole le cal et les deux extrémités fracturées. On a procédé sur les divers fragments frais, préalablement pesés, à la mesure de l'activité phosphatasique et à la détermination du rapport : P/N. Dans un certain nombre de cas, on y a également dosé l'acide ascorbique.

2. Méthodes chimiques.

a) **Dosage de l'activité phosphatasique.** — L'extraction de la phosphatase s'opère suivant la méthode mise au point par ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI [64] : on place dans un tube à essais le fragment d'os et 12 cm³ de solution à 10 g., 16 p. 1000 de β glycérophosphate de soude, dont le pH a été amené à 8,8 par addition de soude 2 N. Après un séjour de 18 heures à l'étuve à 37°, on décante la solution dont on prélève une partie aliquote et on y dose les ions phosphoriques libérés par la méthode de BRIGGS-ROBISON, la lecture colorimétrique étant faite au photomètre à cellule photoélectrique d'Hellige. On rapporte l'activité phosphatasique A à 100 mg. d'azote du stroma protéique de l'os suivant la formule :

$$A = \frac{\text{mg P libéré}}{\text{mg. N dans le fragment d'os}} \times 100$$

b) **Détermination du rapport : P/N.** — Chaque fragment osseux soigneusement lavé est placé dans un pèse-filtre taré à l'étuve à 100-105° jusqu'à poids constant (environ 4 à 5

jours), ce qui permet de déterminer le poids sec de chaque pièce et la teneur en eau du tissu frais. Nous avons étudié le degré de calcification de l'os par l'établissement du rapport : P/N (A. ROCHE et I. GARCIA [61]).

Les fragments squelettiques sont minéralisés en présence de 3 à 5 cm³, suivant le poids, d'acide sulfurique pur et du mélange catalyseur au sélénite de mercure de DUMAZERT et MARCELET [8]. Le produit de la minéralisation est porté à un volume donné et l'on dose le phosphore et l'azote sur des parties aliquotes de la solution. L'azote est dosé par la méthode de Kjeldhal dans l'appareil de PARNAS et WAGNER, et le phosphore suivant la technique submicroanalytique mise au point par DUMAZERT et MOURGUE [9].

c) **Dosage de l'acide ascorbique.** — Nous avons procédé de la manière suivante pour les dosages d'acide ascorbique. Dès la mort de l'animal, nous avons prélevé différents os que nous avons soigneusement nettoyés et débarrassés de toute trace de moelle. Chaque fragment osseux parfaitement nettoyé et divisé au maximum pour permettre la diffusion de l'acide ascorbique, a été pesé et l'extraction de la vitamine C effectuée à l'aide d'une solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100 (environ 10 cm³ par 0 g.,45 d'os). Après un contact d'une dizaine de minutes, on décante et l'on dose l'acide ascorbique en solution à l'aide d'une solution de 2-6 dichlorophénolindophénol à 26 mg.,8 p. 100 cm³. Pour chaque série de dosages, on vérifie le titre du réactif à l'aide d'une solution d'acide ascorbique à 10 mg. p. 100.

Nous avons en outre fait un certain nombre de dosages d'acide ascorbique dans l'urine par la méthode de MANCEAU, POLICARD et FERRAND [43]. Cette méthode nous a donné toute satisfaction et nous n'ajouterons à la description faite par les auteurs qu'une indication dont l'absence dans la technique originale peut être préjudiciable. L'un de ses temps comporte l'addition de carbonate de calcium au mélange de l'urine et des réactifs. Il convient de n'employer pour cet usage que du carbonate de calcium *neutre*, soigneusement lavé jusqu'à ce que les suspensions ne se colorent plus en rose par addition de phénolphthaléine. L'emploi de poudres de ce sel faiblement alcalines favorise, en effet, l'autoxydation de l'acide ascorbique.

C. — MARCHE DES EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Afin de bien situer nos recherches dans le cadre du sujet étudié et de faciliter toute comparaison utile, nous avons fait précéder l'exposé des résultats de chaque type d'expérience d'un résumé des travaux antérieurs poursuivis sur le même sujet.

I. — *Etablissement de données sur l'ossification du Cobaye normal.*

Trois catégories de données, à savoir : la valeur de l'indice de calcification (P/N), l'activité phosphatasique, le taux de l'acide ascorbique, peuvent apporter des indications utiles à la discussion du problème qui nous préoccupe. Nous les avons établies chez des Cobayes normaux, afin de disposer d'une base expérimentale permettant d'apprécier les troubles de l'ossification des animaux fracturés et des scorbutiques.

I. — INDICE DE CALCIFICATION.

D'après TEISSIER [67], la croissance des mammifères évoluerait en trois étapes caractérisées par une vitesse particulière du développement de l'organisme. A la suite de ces expériences, A. ROCHE et I. GARCIA [61] ont étudié les variations de composition des os longs chez le Rat blanc. D'après ces auteurs, la composition du squelette subirait des variations au cours de la croissance et la minéralisation de la matrice protéique se ferait en trois étapes correspondant à celles décrites par TEISSIER.

Reprenant cette étude pour généraliser les résultats obtenus, A. ROCHE, J. ROCHE et MARCELET [62], ont étudié les variations du rapport : P/N de différents os — os longs des membres, os plats membraneux de la voûte crânienne, omoplates, incisives — au cours de la croissance et à l'état adulte chez des Rats normaux.

Il résulte de leur travail que la composition du squelette présente au cours de la vie une succession de modifications synchrones, indépendantes des mécanismes histologiques de

l'ossification. Dans la première partie de la vie des animaux l'évolution et l'organisation du squelette se font en trois étapes : les os se minéralisent et présentent tous simultanément des périodes successives d'enrichissement en sels ; c'est surtout en fin de croissance que les réserves minérales osseuses se forment. Mais ces résultats ne sont-ils pas particuliers au Rat et doit-on les considérer comme pouvant être étendus sans contrôle à d'autres espèces ?

Nos recherches devant nécessairement porter sur le Cobaye, nous avons été dans l'obligation d'établir des données de référence sur des animaux de cette espèce présentant des poids divers. Les résultats obtenus sur 41 Cobayes normaux, d'un même élevage, ont été réunis dans le Tableau I.

TABLEAU I. — *Teneurs en phosphore (P) et azote (N) des diaphyses des radius de Cobayes normaux de poids divers et rapport : P/N.*

Poids de l'animal (g.)	P p. 100 (poids sec)	N p. 100 (poids sec)	P/N
55	27,6	5,72	4,99
60	20,96	5,35	3,91
65	19,00	5,40	3,51
72	16,30	5,00	3,26
80	16,70	4,82	3,47
82	16,62	5,07	3,19
90	15,03	3,30	4,54
108	14,60	3,46	4,21
112	12,63	3,49	3,63
125	13,80	3,16	4,36
150	13,62	3,20	4,25
155	15,72	3,44	4,56
160	16,55	4,20	3,94
172	13,08	3,84	3,40
190	13,26	3,62	3,66
220	12,75	3,90	3,24
220	13,24	3,36	3,94
223	14,50	4,19	3,46
250	13,33	3,24	4,11
280	15,80	4,30	3,67
290	18,00	4,86	3,70

TABLEAU I (suite).

Poids de l'animal (g.)	P p. 100 (poids sec)	N p. 100 (poids sec)	P/N
300	14,34	4,50	3,18
300	15,10	4,38	3,44
332	13,06	3,64	3,58
340	14,31	4,20	3,40
372	12,55	3,23	3,88
400	16,87	3,48	4,80
420	17,54	4,07	4,31
450	13,87	4,30	3,22
460	12,50	3,77	3,31
475	13,88	4,03	3,44
522	12,80	3,25	3,93
525	12,80	3,25	3,93
580	13,90	3,31	4,20
605	12,62	4,06	3,10
610	11,54	3,47	3,32
680	10,97	3,37	3,25
700	16,10	3,50	4,60
720	13,21	4,08	3,24
770	13,60	3,80	3,55

Valeurs moyennes pour les animaux de 300 à 770 g. : P % = 14,38 ;
N % = 3,77 ; P/N = 3,81 ; (écart moyen : 11,5 %).

Il est manifeste que le *Cobaye* et le *Rat* présentent des différences très importantes dans l'évolution de l'ossification de leur squelette. Alors que les os longs du Rat sont très faiblement minéralisés dans les premières semaines de la vie, puis se chargent en sels par étapes successives et ne parviennent à un degré de minéralisation correspondant à celui de l'os des animaux adultes que bien après leur puberté, il n'en est pas de même chez le Cobaye. Les os longs de cet animal ont, dès le jeune âge, une composition identique à celle des adultes. Le degré de minéralisation des pièces squelettiques est le même chez les sujets de 50-70 grammes et chez ceux de 600-700 et cela sans que des variations aient été observées entre ces deux limites. C'est d'ailleurs là sans doute une des raisons pour laquelle le Cobaye est remarquablement peu sensible au rachitisme.

En ce qui concerne la minéralisation de ses os, comme à d'autres égards (aptitude à la locomotion, réserves martiales, etc...) le jeune Cobaye est donc beaucoup plus « évolué » que le jeune Rat et, par ailleurs, ses os sont à cet égard pratiquement comparables à ceux de l'adulte. Du point de vue qui nous préoccupe, ce fait a pour conséquence de permettre des comparaisons du rapport : P/N sans tenir compte du poids des animaux, alors que de tels rapprochements ne peuvent pas être faits chez le Rat.

Si l'on en excepte quelques valeurs très élevées rencontrées aussi bien chez des animaux très jeunes que chez des sujets en fin de croissance ou adultes, *la moyenne des données obtenues oscille autour de 3,6-3,7 dans la diaphyse radiale du Cobaye pesant de 100 à 800 grammes*, comme dans les diaphyses ou les os membraneux du Rat adulte.

2. ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE.

J. ROCHE, FILIPPI et LEANDRI [64], A. FILIPPI [12] ont poursuivi des recherches sur la participation d'une phosphatase à la calcification des os longs au cours de la croissance chez le Rat.

Il ressort de leurs expériences que les os ne sont riches en phosphatase qu'au début de la vie, dans la période où leur croissance est très intense. De même dans les organes dentaires en voie de développement (ROCHE et BULLINGER [63]). L'enzyme disparaît pratiquement des os chez le Rat dès que les animaux ont dépassé le poids de 60-70 g. ; il n'intervient donc que dans la première phase de la formation de ceux-ci. Désireux d'expérimenter sur des Cobayes adultes, nous avons institué quelques contrôles pour préciser si, chez eux comme chez le Rat adulte, les diaphyses osseuses ne présentent qu'une activité phosphatasique très minime, auquel cas on pouvait espérer facilement mettre en évidence son augmentation sous l'influence de divers facteurs. Voici quelques données obtenues sur des radius de Cobayes normaux adultes.

TABLEAU II. — *Activités phosphatasiques des diaphyses des radius droit et gauche de Cobayes normaux (1).*

Poids de l'animal (g)	Poids de l'os frais (mg.)	Activité phosphatique
382	D 83	2,16
	G 88	2,04
400	D 99	6,93
	G 82	6,03
490	D 109	1,03
	G 92	1,21
500	D 120	0,84
	G 120	0,84
490	D 120	0,84
	G 100	1,00

(1) Dans ce tableau et dans ceux qui vont suivre, les os droits et gauches (radius) sont respectivement désignés par les lettres D et G.

Les activités phosphatasiques des radius de Cobayes normaux adultes sont donc presque nulles.

3. TENEUR EN ACIDE ASCORBIQUE DES OS ET DENTS DE COBAYES NORMAUX.

Il ressort des travaux de GIROUD, RATSIMAMANGA et LEBLOND [22] sur la répartition de l'acide ascorbique dans l'organisme, que la vitamine C est présente dans tous les organes, sa teneur étant élevée surtout dans les glandes endocrines. La moelle osseuse en contiendrait de petites quantités, les chiffres moyens étant 11 mg. p. 100 de tissu frais pour la moelle jeune hématopoïétique et de 2 mg.,4 pour la moelle adulte et grasseuse. Les os seraient très pauvres en vitamine C.

A titre de contrôle et pour disposer de données obtenues dans les conditions où nous nous sommes placés pour l'ensemble de nos expériences nous avons fait quelques dosages d'acide ascorbique sur les os, les dents, la moelle de cobayes normaux adultes et de cobayes en croissance. Voici les résultats obtenus :

TABLEAU III. — *Teneurs en acide ascorbique (mg. p. 100 g. d'organe) d'os et d'incisives de Cobayes normaux.*

Organe	Poids (mg.)	Acide a-scorbique (mg. p. 100)
<i>Cobaye normal (132 g.)</i>		
Cartilage de conjugaison	49,5	6,20
Tibia { Diaphyse	181,5	3,91
{ Epiphyse	97,5	7,27
Fémur { Diaphyse	189,5	4,82
{ Epiphyse	59	8,59
Radius { Diaphyse	50,5	5,00
{ Epiphyse	36	8,58
Dents { Racine	43	9,40
{ Pointe	56	7,25
Moelle	82,5	6,13

Cobayes normaux (142 g. et 108 g.) ayant reçu quotidiennement deux milligrammes d'acide ascorbique pendant 9 jours (1).

Métaphyses (mélange)	175	9,52
Humerus	338,5	2,71
Fémur	411	3,33
Radius droit	66	6,95
Radius gauche	53	8,66
Cubitus droit	96	4,78
Cubitus gauche	114	4,03
Dents { racine	34,5	14,00
{ pointe	169,5	3,38
Tibia	354	2,75
Moelle	154,5	13,33

Cobaye normal de 176 g.

Radius { épiphyse	60,5	8,16
{ diaphyse	40,2	4,10
Dents { racine	54,2	9,70
{ pointe	80,9	2,12

Cobaye normal de 300 g.

Radius { épiphyse	80,2	7,12
{ diaphyse	50,1	4,10
Dents { racine	61,4	10,20
{ pointe	90,1	3,20

Cobaye normal de 400 g.

Dents (tot.)	348,0	3,73
Fémur (tot.)	537,0	5,02
Cubitus (tot.)	333,0	8,39

(1) Les os des deux Cobayes ont été réunis et les dosages effectués sur la totalité.

TABLEAU III (suite).

Organe		Poids (mg.)	Acide ascorbique (mg. p. 100)
<i>Cobaye normal de 600 g.</i>			
Radius	épiphyse	110	4,02
	diaphyse	152	3,24
Dents	racine	102	7,96
	pointe	264	2,10
<i>Cobaye normal de 310 g.</i>			
Radius	épiphyse	80,4	7,12
	diaphyse	56,9	3,60
Dents	racine	71,2	8,80
	pointe	90,2	4,02
<i>Cobaye normal de 400 g.</i>			
Radius	épiphyse	80,2	6,40
	diaphyse	54,2	3,60
Dents	racine	70,2	8,12
	pointe	90,1	4,00
<i>Cobaye normal de 490 g.</i>			
Fémur (tot.)		656,5	2,17
Cubitus (tot.)		263,0	3,26
Dents (tot.)		322,0	4,34
Moelle		280	10,2
<i>Cobaye normal de 665 g.</i>			
Radius	épiphyse	120	3,48
	diaphyse	192	3,72
Dents	racine	96	10,2
	pointe	286	2,78

Ces résultats permettent de constater divers faits pouvant être mis à profit pour nos expériences ultérieures. D'une part, toutes les pièces squelettiques n'ont pas une teneur identique en acide ascorbique chez un même animal et, dans l'une de celles-ci, certaines régions renferment plus de vitamine C que d'autres. Dans l'ensemble, *les zones osseuses ou dentaires en développement actif contiennent plus d'acide ascorbique que les autres*, comme il ressort de comparaisons que l'on peut faire à cet égard entre les épiphyses et la diaphyse d'un os long, la racine et la pointe des incisives. D'autre part, les os des animaux jeunes sont légèrement plus riches en acide ascorbique que ceux des adultes, alors que chez ceux-ci la ra-

cine des dents conserve une teneur relativement élevée en vitamine.

Dans l'ensemble le système osseux est pauvre en acide ascorbique, celui-ci étant localisé dans les régions de croissance active. Il convient toutefois de remarquer que si l'on tient compte de la surcharge en sel des os, les zones de ces organes en voie de développement renferment des quantités notables d'acide ascorbique, car la partie organique des os ne correspond guère qu'à un quart de leur poids total. La diaphyse osseuse normale de l'animal adulte présente une teneur moyenne en acide ascorbique de 3,7 mg. p. 100. Cette donnée nous servira ultérieurement de base de comparaison.

II. — *Minéralisation et activité phosphatasique des os longs dans le scorbut en évolution.*

Le scorbut a fait l'objet de recherches diverses. Nombreux sont les auteurs qui se sont intéressés à cette maladie aux symptômes si caractéristiques, mais peu d'entre eux ont apporté des données chimiques sur son action osseuse. Les animaux atteints de scorbut présentent des signes squelettiques bien particuliers que nous avons décrit précédemment. Des modifications histologiques apparaissent dans le tissu osseux. L'os perd du poids, sa croissance est arrêtée et sa fragilité est telle qu'elle peut entraîner des fractures spontanées. Mais, d'après MOREL, MOURIQUAND, MICHEL et THÉVENON [50], MOURIQUAND, LEULIER et MICHEL [52], il n'y aurait pas de décalcification notable, décelable par la radiographie et chimiquement. Les chiffres suivants, empruntés à MOURIQUAND, LEULIER et MICHEL en témoignent [52].

	Os étudié	Cendres	CaO p 100	P ₂ O ₅ p 100
Os longs	{ Normal	59,3	28,7	
	{ Scorbutique	57,8	28	
Mâchoires	{ Normal	71,38	38,64	27,54
	{ Scorbutique	70,48	38,57	27,33
Incisives	{ Normal	77,24	41,83	33,20
	{ Scorbutique	77,83	42,10	32,89

En somme, contrairement à ce que pourrait faire penser l'examen anatomo-clinique, il n'y a ni décalcification, ni réduction du taux du phosphore des os chez le Cobaye scorbutique, même quand la fragilité osseuse est devenue très grande.

Nous avons provoqué le scorbut expérimental chez onze Cobayes que nous avons sacrifiés après des temps plus ou moins longs d'alimentation à un régime carencé. L'analyse de leurs os, présentant à l'examen une fragilité et une minceur caractéristiques, a été reportée dans le tableau IV.

Quant à l'activité phosphatasique des diaphyses osseuses

TABLEAU IV. — *Teneurs en phosphore (P) et en azote (N) et rapport : P/N des diaphyses des radius de Cobayes soumis à un régime scorbutigène.*

Poids de l'animal (g.)		Jours de régime scorbutigène	Poid sec de l'os (mg.)	P p. 100	N p. 100	P/N	Activité phospha- tasique
initial	final						
540	410	9	D 130	11,30	3,34	3,34	—
700	460	10	D 103	13,09	3,91	3,32	6,48
			G 123,5	10,60	3,56	2,97	6,27
480	280	10	D 84	10,70	3,78	2,83	14,37
			G 80	13,20	3,91	3,37	13,07
410	240	11	D 94	11,10	3,67	3,05	—
			G 94	11,70	3,74	3,12	—
620	435	13	D 133,5	11,83	3,55	3,23	—
			G 136	11,80	3,80	3,10	—
580	580	15	D 127	15,06	3,93	3,83	4,79
			G 132	14,61	4,18	3,49	4,06
490	430	17	D 111,5	11,80	3,58	3,21	—
			G 91	12,19	3,70	3,29	—
360	360	25	D 79	14,40	3,67	3,92	9,51
			G 88	14,40	3,43	4,19	12,71
380	240	28 (1)	D 72	11,69	4,95	2,56	14,39
			G 62	18,32	3,40	3,62	28,67
365	260	33 (2)	D 79	13,31	3,83	3,47	13,46
			G 75,5	12,54	2,88	3,29	11,37
270	220	35	D 42,5	12,32	4,61	2,67	20,20
			G 42	13,45	3,45	4,10	25,65
Moyennes				12,54	3,65	3,42	
Ecart moyen						19,60 p. 100	

(1) Os très fragile. (2) Fracture spontanée du radius gauche.

des cobayes scorbutiques, au sujet de laquelle nous n'avons pas trouvé d'indication dans les travaux antérieurs, elle a fait l'objet de recherches dont les résultats ont été rassemblés dans le même tableau.

Il ressort de ces données que l'indice de calcification : P/N ne subit dans la diaphyse radiale que des variations relativement faibles pendant le scorbut. Il présente néanmoins une tendance à s'abaisser traduisant un certain degré de déminéralisation, que reflète également la diminution du taux moyen du phosphore (P p. 100 = 14,38 chez les Cobayes normaux et 12,54 chez les scorbutiques). Celle-ci doit donc aller de pair avec l'importante résorption osseuse caractérisant le scorbut dont on peut facilement se rendre compte en comparant les poids des tibias chez des cobayes normaux et chez des scorbutiques dans nos divers tableaux. Toutefois la déminéralisation est très loin d'être le principal des deux phénomènes.

C'est sans doute le même fait que traduit l'augmentation parfois nette, mais irrégulière, de l'activité phosphatasique des os chez les scorbutiques. Là encore, l'intensité de cette augmentation est faible par rapport à celle que l'on observe dans les très fortes ostéolyses (fractures). De toute manière, c'est avant tout une *résorption osseuse totale* qui se manifeste dans le scorbut.

Ce fait oriente nécessairement l'attention vers la matrice protéique de l'os. En effet, *alors que la déminéralisation (acidose, hormones) comporte le départ des sels et la conservation de la trame organique de l'os, celle-ci disparaît dans le scorbut.*

III. — Étude des Cobayes normaux fracturés.

Nous nous sommes proposés d'étudier l'évolution : 1) du degré de minéralisation, 2) de l'activité phosphatasique, 3) de la teneur en acide ascorbique du squelette (os fracturé et os intacts) au cours de la réparation d'une fracture chez des animaux recevant un régime alimentaire complet additionné ou non d'acide ascorbique. Ces recherches ont été inspirées par divers travaux dont elles constituent en partie la suite. Aussi convient-il de les situer dans le cadre des expériences antérieures,

J. ROCHE et MOURGUE [65] ont suivi par l'indice de calcification : P/N, les modifications de la surcharge en sels des extrémités diaphysaires fracturées au cours de la réparation de la lésion et constaté le fait suivant : dans un premier temps, correspondant à la formation du cal conjonctif, on observe une déminéralisation proressive puis, lorsque la consolidation s'annonce, l'os présente une « reprise » de ses sels. Quant à l'activité phosphatasique des pièces fracturées, elle augmente rapidement après le traumatisme et présente un maximum peu de temps avant la prise du cal (ROCHE et FILIPPI [64]). Or, ces modifications biochimiques du squelette ne sont pas particulières à l'os fracturé. On les rencontre également, à un degré moindre, dans l'ensemble du système osseux dont ils constituent un ensemble de « réactions générales ». La réparation d'une fracture comporte donc un processus local et des phénomènes généraux. Quant à la teneur en acide ascorbique des os pendant leur réparation, elle n'a pas été étudiée à notre connaissance.

Dans une première série d'expériences, nous nous sommes préoccupés de reproduire sur le Cobaye les observations faites par ROCHE et MOURGUE, ROCHE et FILIPPI sur le Rat, afin de disposer d'une base ou comparaison pour des essais ultérieurs à poursuivre chez des Cobayes scorbutiques. Nous avons, en outre, opéré à une échelle plus précise, en ce sens que nous avons séparé les cals des diaphyses qu'ils relient et étudié l'activité phosphatasique et la teneur en acide ascorbique de ce tissu et des fragments osseux voisins.

Deux lots d'animaux ont été mis en expérience. Les uns ont reçu le régime normal complet du chenil ; les autres ont en outre reçu per os de l'acide ascorbique.

Les animaux ont subi une fracture du radius *droit* par torsion à l'aide d'une pince chirurgicale. Une certaine pratique de cette opération sur le cadavre nous a permis de la réaliser à peu près à coup sûr de manière satisfaisante. Le radius est saisi isolément entre les mors d'une pince à griffe, en ayant soin de laisser libre le cubitus. Une torsion de l'os le rompt, faisant une fracture en bec de flûte, en général non esquilleuse. Le cubitus intact servant d'attelle, la lésion se répare facilement et avec une régularité satisfaisante, en sorte que l'organisation du cal peut être étudiée comparativement chez les animaux à un même temps après le traumatisme. Au res-

TABLEAU V. — Teneurs en phosphore (P) et azote (N) et rapports : P/N des diaphyses radiales (cal non compris) de Cobayes normaux à radius droit fracturé (animaux soumis à un régime normal).

Poids de l'animal (g.)	Poids de l'animal (g.)		Nombre de jours après fracture	Signes à la dissection	Poids de l'os sec (mg.)	P p. 100	N p. 100	P/N	Activité phosphatase
	initial	final							
580	435		19	Cal fibreux, début d'ossification.	D 157 G 95,5	12,4 13,4	4,44 3,87	2,90 3,40	46,15 42,48
420	500		23	Cal conjonctif, périoste gonflé...	D 186 G 98,5	12,30 9,98	4,35 3,45	2,82 2,89	33,33 39,64
440	470		23	Cal ossifié	D 212 G 47	13,08 13,90	3,87 4,04	3,42 3,48	51,37 34,73
430	485		24	Consolidation complète.....	D 112,5 G 84,5	12,30 11,57	3,99 3,69	3,08 3,10	13,63 38,70
540	640		27	» »		13,70	3,93	3,51	23,35
380	460		30	» »	D 203 G 75	14,78 15,26	4,20 4,40	2,91 3,46	15,42 20,72
460	530		36	» »	D 131 G 81,5	10,29 12,71	3,66 4,63	2,81 2,74	22,00 11,90
350	460		36	» »	D 116 G 81,5	20,91 14,16	4,09 3,15	5,00 3,85	46,48 44,57

te, lorsque l'autopsie a révélé l'existence d'une fracture irrégulière, les pièces de l'animal ont été éliminées des essais.

1. ANIMAUX NORMAUX NON TRAITÉS PAR L'ACIDE ASCORBIQUE.

Les résultats obtenus sur les animaux ont été rassemblés dans les tableaux V, VI et VII.

Divers faits ressortent de l'examen de ces tableaux. Les voici résumés : L'os fracturé présente toujours une déminéralisation nette de ses fragments jusqu'au moment de la prise du cal, car le rapport : P/N y diminue alors progressivement. Quant à l'activité phosphatasique, elle augmente de manière importante dans la diaphyse lésée ; sa valeur s'élève jusque vers le moment de la consolidation, puis diminue quand celle-ci est atteinte. Son évolution dans le cal isolé, est particulièrement intéressante. Le pouvoir phosphoestérasique demeure faible pendant la période où le cal conjonctif se forme, puis il augmente brusquement dans une période voisine de celle où le cal s'ossifie.

On remarquera, en outre, que les os normaux des animaux d'expérience présentent aussi des modifications de leur indice de calcification et de leur activité phosphatasique, de même que les os porteurs de lésion. Nous avons donc pu retrouver chez le Cobaye la « réaction générale du squelette » après fracture mise en évidence par ROCHE, MOURGUE et FILIPPI, chez le Rat.

TABLEAU VI. — *Activité phosphatasique de cals de Cobayes normaux fracturés à divers temps après le traumatisme.*

Poids de l'animal (g.)	Nombre de jours après la fracture	Signes à la dissection	Poids du cal (mg.)	Activité phosphatasique
520	10	Cal fibreux volumineux...	87	4,71
530	12	Petit cal conjonctif.....	15	11,11
480	14	Cal fibro conjonctif volumineux.....	42	9,03
330	16	Cal conjonctif.....	27	10,67
520	18	Cal conjonctif.....	61	53,60
510	19	Début d'ossification.....	49	62,40
480	20	Début d'ossification.....	52	46,10
520	21	Cal osseux fragile.....	45	22,40
480	30	Cal osseux solide.....	54	5,63
515	30	Cal osseux solide.....	60	4,90

TABLEAU VII. — Teneur en acide ascorbique (mg. p. 100 g.) des os, des dents (incisives) et de la moelle de Cobayes adultes fracturés du radius droit, soumis à un régime normal, et recevant chaque jour 1 milligramme d'acide ascorbique.

Poids de l'animal (g.)	Durée du traitement (jours)	Signes à la dissection	Moelle	Fémur	Tibia	Humérus	Radius		Cubitus		Dents	
							D	G	D	G	racine	pointe
544	7	Petit cal conjonctivo-musculaire	7,60		1,67	5,50	3,16		4,94		5,95	1,50
300	11	Cal conjonctif	24,6	3,2	2,86	6	11,9		6,16		22,5	3,4
400	15	Cal conjonctif, volumineux	27,8	3,98	2,70	9,67	9,44	7,55	4,5		10,73	7,72
540	18	Cal fibreux, volumineux..	9,78	1,01	0,99	1,70	4,45	3,14	2,28	1,87	8,55	4,95
600	19	Cal fibro-conjonctif important	9,63	1	0,44	0,60	2,88	2,65	1,36		5,40	2,19
520	20	Cal osseux	7,06	1,77	0,84	1,94	1,70	3,24	1,60		8,11	4,81
540	21	Cal osseux	11,01	0,93	0,76	1,29	2,74	5,4	1,28		5,56	1,38
540	22	Cal en voie d'ossification..	11,60	0,69	0,60	1,18	5,14	2,90	2,32	1,66	4,80	1
560	25	Grande activité périostique. Cal important mais pas de soudure complète.	11,26	1,06	0,74	2,38	9,91	3,26	2,71	3,50	7,39	2,07
600	27	Cal osseux	10	0,57	1,80	2,25	9,72	2,88	1,55	2,98	9,17	4,22

2. ANIMAUX NORMAUX TRAITÉS PAR L'ACIDE ASCORBIQUE.

Dans cette partie de notre travail, nous avons surtout cherché à préciser le mécanisme d'action de l'acide ascorbique au cours de la régénération osseuse et son taux dans les différentes parties de l'os fracturé et de tous les autres os longs du squelette, ainsi que dans les dents et la moelle osseuse.

Vingt-six Cobayes fracturés du radius droit ont reçu une alimentation normale, accompagnée journellement d'une quantité connue d'acide ascorbique administrée par voie buccale. Les uns ont reçu 5 mg., d'autres 1 mg. en solution aqueuse préparée extemporanément. Nous avons dosé l'acide ascorbique dans tous les os, le cal et dans un fragment de muscle prélevé au voisinage immédiat du cal sur les cobayes du premier lot. Le prélèvement musculaire a été fait afin de disposer d'un fragment témoin du tissu à partir duquel le cal s'est constitué.

Pour les animaux du second lot, ayant reçu quotidiennement un mg. d'acide ascorbique, nous avons effectué exactement les mêmes dosages, sauf dans le cal, lequel a servi à la détermination de l'activité phosphatasique. Quelques Cobayes du même lot ont reçu 2 mg. par jour d'acide ascorbique ; nous avons dosé l'activité phosphatasique de leur cal.

Les résultats obtenus ont été groupés dans les tableaux VII, VIII et IX.

Les documents rassemblés dans les tableaux VII et VIII mettent en évidence deux faits importants sur la localisation de l'acide ascorbique dans les os chez les animaux fracturés.

D'une part, la teneur en vitamine C des os du Cobaye normal est, comme on l'a vu, très minime et, par ailleurs, elle présente des variations nettes dans les diverses régions des os fracturés au cours de la réparation des lésions. *Au niveau du cal on observe chez les animaux recevant quotidiennement 5 mg. d'acide ascorbique une accumulation de celui-ci* telle que le taux de la vitamine peut y être dix fois plus élevé que dans les tissus à partir desquels le cal se forme et deux à trois fois plus grand que dans la diaphyse lésée (radius droit). *Cet enrichissement du cal en acide ascorbique est passager. Déjà net peu de jours après la fracture, il présente un maximum du douzième au quinzième jour et disparaît vers le vingtième jour d'expérience.* Or, c'est précisément à cette date

TABLEAU VIII. — *Teneurs en acide ascorbique (mg. p. 100 g.) des os des dents (incisives) et de la moelle de Cobayes fracturés du radius droit, et recevant 5 mg. par jour d'acide ascorbique.*

Poids de l'animal	Durée du traitement (jours)	Signe à la dissection	Moëlle	Fémur	Tibia	Hu- mèrus	Radius D G	Cubitus D G	Cal	Muscle	Dents Racine Pointe
434	7	Ebauche de cal.....	14,34		2,41	3,08	5,65 3,72	2,89	7,97	1,40	7,35 2,20
540	7	Ebauche de cal.....	7,79	5,27	3,32	2,84	5,19 4,43	1,24	21,95	0,97	5,65 3,91
500	8	Ebauche de cal.....	10,10	4,00	2,12	2,40	6,02 5,40	2,42	40,00	1,04	9,76 3,02
500	8	Grosse ébauche de cal conjonctif.....	12,52	1,67	1,79	2,08	8,94 5,88	6,54 3,32	40,00	2,6	10,3 3,39
540	10	Cal fibro-conjonctif très gros.....	31,70	4,71	1,22	2,54	7,63 5,2	4,44 2,13	7,77	1,06	13,62 3,06
350	12	Cal conjonctif.....	72,10	6,16	3,87	2,76	12,1 10,9	5,14	27,5	2,82	31,9 8,7
500	12	Cal fibreux assez gros...	9,68	1,53	0,69	1,90	3,96 3,02	1,59	26,3	0,65	9,72 1,90
480	15	Cal conjonctif.....	13,82	1,11	0,95	1,35	4,78 3,58	2,50 2,21	6,23	2,97	7,14 2,43
430	15	Cal conjonctif.....	6,97	1,55	1,25	2,19	11,6 3,77	1,75	46,71	3,42	11,3 2,63
520	16	Très léger début de cal- cification.....	13,56	3,60	2,08	3,37	5,87 6,18	2,11	7,19	2,29	6,68 2,20
520	18	Début de calcification...	5,31	1,20	1,72	2,16	11,25 7,92	2,09	3,49	1,11	5,85 2,17
540	20	Activité périostique, mais fracture incomplète - ment réparée.....	12,12	1,49	1,11	1,66	3,98 3,14	1,88	6,05	1,51	3,22 2,38
500	21	Cal partiellement ossifié...	9,63	0,81	0,89	1,52	3,98 2,22	1,84	3,98	—	3,28 1,06
530	22	Cal osseux assez fragile.	12,94	0,70	0,74	0,87	2,55 3,05	1,74	4,45	0,74	3,60 1,39
450	25	Col osseux solide.....	8,82	1,10	0,92	1,52	6,26 3,99	2,29	3,19	2,76	6,25 2,26
440	27	Cal osseux solide.....	15,66	0,70	1,10	1,76	6,35 3,39	3,80	3,67	3,39	4,39 1,40
570	29	Cal osseux solide.....	5,35	0,71	0,75	1,37	2,73 2,83	1,47	2,81	4,3	5,80 1,47

que la consolidation a lieu. Le cal accumule donc l'acide ascorbique dans la période qui correspond à l'organisation conjonctive du cal et dans cette période seulement, puisque la calcification s'opère à un stade d'évolution du cal où celui-ci ne contient pas plus d'acide ascorbique que l'os normal intact. Ce fait suggère l'hypothèse d'une participation de la vitamine C à la formation de la matrice protéique de l'os de réparation et non à sa minéralisation.

D'autre part, le phénomène que nous venons de décrire est très net dans le cal, mais il ne lui est pas particulier. On l'observe, en effet, dans les fragments de la diaphyse fracturée et aussi dans l'ensemble des pièces squelettiques. Il y a donc en période d'évolution de fracture une fixation générale d'acide ascorbique par les os dans la première quinzaine qui suit la lésion. C'est là une nouvelle manifestation des « réactions générales du squelette » sur lesquelles ROCHE, MOURGUE et FILIPPI ont attiré l'attention. Il est actuellement difficile de relier ces diverses manifestations les unes aux autres, mais leur existence est hors de doute.

TABLEAU IX. — *Activité phosphatasique de cals de Cobayes fracturés normaux traités à la vitamine C.*

Durée de l'expérience (jours)	Signes à la dissection	Poids de l'animal (g.)	Poids du cal (mg.)	Activité phosphatasique
A. — Animaux recevant 1 mg. d'acide ascorbique par jour.				
15	Cal fibroconjonctif	400	35,5	2,95
18	Cal fibreux volumineux.....	540	58	4,80
19	Cal fibroconjonct f abondant...	600	230,5	17,98
20	Début d'ossification du cal... ..	520	49,5	83,35
21	Cal osseux solide	540	73	9,84
22	Cal osseux solide	540	135,5	9,32
25	Cal osseux solide	560	132,5	1,28
27	Cal osseux solide	600	140,6	0,67
B. — Animaux recevant 5 mg. d'acide ascorbique par jour.				
15	Cal fibroconjonctif.....	580	84	6,58
20	Cal en voie d'ossification	650	66,5	22,8
21	Cal en voie d'ossification	740	115	19,6
21	Cal en voie d'ossification	660	190	22,39
27	Cal osseux solide	440	134	1,91
27	Cal osseux solide	490	42,5	1,58

Le tableau IX contient des données relatives à l'activité phosphatasique du cal en évolution. Ces données sont significatives en elles-mêmes et par leur coordination avec les précédentes.

Il est clair que le cal s'organise pendant une longue période sans contenir de phosphatase. A cet égard, sa formation reproduit celle des os et des dents embryonnaires (ROBISON et FELL ; ROCHE et BULLINGER). L'enzyme apparaît brusquement, son activité devient en quelques jours très importante, puis diminue jusqu'au niveau de celle de la diaphyse normale. Or, le cal conjonctif est presque dépourvu d'activité phosphatasique pendant le temps où il emmagasine de l'acide ascorbique. Ce n'est qu'après la diminution de taux de celui-ci qu'il devient riche en enzyme. Phosphatase et vitamine C doivent donc nécessairement participer à deux processus différents de l'organisation du cal évoluant l'un après l'autre. Nous discuterons plus bas cette manière de voir, mais il convient de signaler dès maintenant que, contrairement aux idées formulées par BOTTEREL et KING la teneur du cal en enzyme n'est pas parallèle à sa calcification. Comme l'ont noté ROCHE et BULLINGER [63] dans diverses pièces squelettiques en voie de formation, la période d'activité phosphatasique maxima précède la « prise » de l'os.

IV. — *Etude des Cobayes scorbutiques fracturés traités ou non par l'acide ascorbique.*

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié l'indice de calcification et l'activité phosphatasique des os d'animaux scorbutiques fracturés, afin de les comparer à ceux des animaux fracturés recevant un régime complet et à ceux des animaux scorbutiques non fracturés. Disposant des documents exposés au cours des précédents paragraphes, nous avons pu chercher à établir des comparaisons sur des bases assez satisfaisantes.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons étudié, grâce aux mêmes méthodes de recherches, l'action de l'acide ascorbique sur l'évolution des fractures. La valeur thérapeutique de la vitamine C, déjà observé par certains auteurs et mise en doute par d'autres, s'est révélée manifeste dès le début de ces expériences. Aussi nous sommes-nous efforcés, non

pas tant de multiplier les observations que de faire varier les conditions d'administration de l'acide ascorbique pour préciser dans quelle mesure elles influent sur l'efficacité de celui-ci. Nous avons examiné le cas de l'animal scorbutique traité par l'acide ascorbique à divers temps après la lésion osseuse et l'avons comparé à celui de l'animal passant du régime complet au régime scorbutigène pendant les mêmes périodes.

1. ANIMAUX AU RÉGIME SCORBUTIGÈNE PENDANT DES PÉRIODES PLUS OU MOINS LONGUES APRÈS FRACTURE D'UN OS.

a) Onze Cobayes ont été mis au régime scorbutigène le jour même où ils ont subi une fracture expérimentale de leur radius droit. Ils ont été sacrifiés successivement à des temps divers correspondant à chacun des stades de l'évolution du cal chez les témoins normaux, l'expérience ne pouvant être prolongée au-delà de la limite de survie habituelle des scorbutiques.

Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau X.

Les résultats de cette expérience indiquent nettement que *la mise des animaux au régime scorbutigène empêche la réparation des fractures.*

En effet, on observe une ébauche de formation d'un cal conjonctif dans les dix à douze jours qui suivent la fracture ; celle-ci regresse rapidement et disparaît lorsque l'on prolonge l'expérience. Au bout de vingt à trente jours de régime scorbutigène les fragments osseux présentent la plupart du temps l'aspect d'une diaphyse fraîchement fracturée, à ceci près que l'os, très mince et papyracé, est friable comme celui des scorbutiques. Or, les Cobayes recevant une alimentation normale réparent leurs fractures en vingt-cinq jours environ.

L'étude biochimique des os révèle divers faits. Le rapport : P/N des diaphyses fracturées s'abaisse légèrement pendant la période d'étude, mais l'os sain ne présente pas une déminéralisation plus forte que celui porteur de la lésion, tandis que tel est le cas chez les animaux normaux. Les valeurs sont du même ordre que chez les animaux scorbutiques à squelette intact : la substance osseuse disparaît en totalité beaucoup plus qu'elle se déminéralise, et cela même au foyer de fracture. *Tout se passe comme si les troubles scorbutiques avaient en quelque sorte le pas sur ceux que provoque habituellement la fracture.* L'existence de ceux-ci n'en est pas moins nette-

TABLEAU X. — Teneurs en phosphore (P) et azote (N) et rapports : P/N des diaphyses radiales de *Cobayes à radius droit fracturé* (animaux soumis à un régime scorbutigène).

Poids de l'animal (g.)		Nom. br. de jours	Signes à la dissection	Poids sec des os (mg.)	P p. 100	N p. 100	P/N	Activité phosphatase
initial	final							
390	225	10	Petite ébauche conjonctive.....	D 93,5 G 85,5	13,20 14,25	4,74 4,35	2,78 3,28	— —
400	260	13	Fracture non soudée	D 62 G 62	12,04 12,41	3,83 4,11	3,43 3,01	106,8 48,40
460	375	19	Aucune ébanche de cal, fragments séparés.....	D 95 G 101,5	12,30 12,60	3,73 3,71	3,30 3,30	78,00 17,36
330	360	23	Pas de cal conjonctif, périoste granuleux.....	D 174,5 G 73,5	10,76 10,28	3,38 2,98	3,48 3,44	63,45 12,57
390	350	23	Pas de réparation récente.....	D 92 G 79,5	11,63 31,62	3,26 10,84	3,56 2,91	43,20 9,00
350	280	27	Pas de cal	D 85,5 G 78,5	13,81 13,18	3,56 3,63	3,87 3,63	37,37 13,47
410	280	27	Pas de cal	D 84,5 G 57,5	12,24 19,74	3,43 5,30	3,56 3,72	19,44 9,05
340	260	27	Pas de cal	D 82,5 G 82,5	13,53 14,86	3,21 3,75	4,21 3,96	66,56 13,16
400	280	30	Pas de cal	D 62 G 70,5	14,66 13,07	4,24 3,82	3,45 3,42	39,69 13,77
490	320	31	Pas de cal	D 109 G 78,5	11,94 12,26	3,76 3,85	3,46 3,18	17,26 8,31
550	380	31	Pas de cal	D 109,5 G 97	12,27 11,74	3,74 3,60	3,28 3,26	9,07 5,71

ment mise en évidence par l'augmentation importante de l'activité phosphatasique de la diaphyse lésée, nettement supérieure à celle de l'os homologue sain dans les premières semaines qui suivent le traumatisme.

b) Trois Cobayes fracturés le premier jour de l'expérience ont été mis immédiatement au régime scorbutigène 15 jours, puis au régime normal 12 à 14 jours environ. Dès les 15 premiers jours on note une diminution de poids nette des animaux ; mais, dès que nous remettons ces animaux au régime normal, la consolidation commence et, au moment où nous les sacrifions, nous observons une prolifération des tissus avec début de cal.

Cette expérience, en quelque sorte complémentaire de la précédente, confirme ses résultats. Si l'on soumet pendant quinze jours des animaux au régime scorbutigène, puis pendant quatorze jours au régime normal leurs fracture n'est pas consolidée à la fin de cette dernière période, alors qu'elle le serait avec l'alimentation complète du chenil. Ce fait s'explique aisément : *le retard de la réparation osseuse est dû à celui de la formation du cal pendant la première partie des essais.*

TABLEAU XI. — *Teneurs en phosphore (P) et azote (N), rapport : P/N et activités phosphatasiques des diaphyses radiales de Cobayes adultes ayant le radius droit fracturé alimentés pendant une première période avec un régime scorbutigène (R. S.), puis pendant une seconde avec un régime complet (R. N.).*

Durée des diverses périodes et variations du poids des animaux		Signes à la dissection		P p. 100	N p. 100	P/N	Acti- vité phos- phata- sique
R. S.	R. N.						
5 j. (500-320 g.)	12 j. (320-450 g.)	Début d'ossification, prolifération du tis- su osseux.....	D G	10,55 13,42	4,14 3,55	2,54 3,78	42,78 15,91
5 j. (550-350 g.)	14 j. (350-520 g.)	Début de cal fibreux.	D G	13,23 13,73	4,1 3,66	3,22 3,75	75,36 6,46
5 j. (560-350 g.)	14 j. (350-540 g.)	Début d'ossification ..	D G	10,27 11,44	3,96 3,60	2,59 3,17	39,21 8,26

L'examen biochimique des os (Tableau XI) traduit la reprise tardive de l'évolution normale de la fracture. En effet,

d'une part l'hyperactivité phosphatasique du foyer persiste un mois après le traumatisme, ce que l'on observe jamais normalement. D'autre part, les fragments sont le siège d'une déminéralisation nette tant que le cal ne s'est pas bien formé, alors que chez le scorbutique il y a perte de substance osseuse totale dans les mêmes conditions.

Le passage au régime normal fait donc, en quelque sorte, reprendre le pas à l'évolution de la fracture sur le scorbut.

c) Trois Cobayes normaux ont été fracturés, laissés au Régime normal pendant vingt-quatre jours, puis soumis à un régime scorbutigène de douze à seize jours. Les résultats obtenus figurent dans le tableau XII.

TABLEAU XII. — *Teneurs en phosphore (P) et azote (N), rapports P/N et activités phosphatasiques des diaphyses radiales de Cobayes adultes ayant le radius droit fracturé alimentés pendant une première période avec un régime complet (R. N.), puis pendant une seconde avec un régime scorbutigène (R. S.).*

Durée des diverses périodes et variations du poids des animaux		Signes à la dissection		P p. 100	N p. 100	P/N	Acti- vité phos- phata- sique
R. N.	R. S.						
24 j. (540-500 g.)	12 j. (500-445 g.)	Cal osseux solide	D	11,93	4,08	2,92	23,40
			G	12,34	3,94	3,13	8,31
25 j. (500-540 g.)	16 j. (540-490 g.)	Fracture réparée	D	12,26	3,81	3,22	16,78
			G	11,40	3,98	2,87	14,61
25 j (460-515 g.)	16 j (515-440 g.)	Fracture réparée	D	12,1	3,65	3,31	25,75
			G	12,26	3,49	3,51	24,56

Ces essais complètent ceux de la série précédente. Ils établissent qu'après consolidation de la fracture en vingt-cinq jours environ, le cal ne régresse plus par mise au régime scorbutigène des animaux. On n'observe plus alors d'autre modification de la composition ou de l'activité phosphatasique des os que celles notées chez les animaux témoins. La seule particularité qu'il convient de noter est une valeur anormalement basse du rapport : P/N dans la diaphyse réparée. *Tout se passe comme si l'évolution du cal en période de minéralisation n'était pas ralentie par la carence de celle-ci.*

Les trois séries d'expériences dont nous venons d'examiner les résultats établissent que la réparation osseuse n'a pas lieu ou est très fortement gênée en l'absence d'acide ascorbique dans le régime avant le début de la consolidation.

TABLEAU XIII. — *Teneurs en phosphore (P) et en azote (N), rapport : P/N et activité phosphatasique des diaphyses radiales de Cobayes adultes soumis pendant une période à un régime scorbutigène (R. S.), puis traités à l'acide ascorbique après fracture de leur radius droit (F. Vit. C.).*

Durée des diverses périodes et variations du poids des animaux		Dose quotidienne de vitamine C	Signes à la dissection	P p. 100	N p. 100	P/N	Activité phosphata- sique
R. S.	F. Vit. C.						
10 j. (440-350 gr.)	18 j. (350-440 gr.)	5 mg.	Cal osseux	D 10,04 G 9,88	3,90 3,43	2,57 2,88	65,40 26,63
10 j. (310-280 gr.)	24 j. (280-260 gr.)	3 mg.	Cal osseux	D 13,86 G 14,70	3,90 3,88	3,54 3,71	96,45 5,11
14 j. (540-440 gr.)	15 j. (440-400 gr.)	3 mg.	Cal solide	D 11,16 G 9,85	3,76 2,98	3,23 3,33	37,67 13,40
14 j. (410-340 gr.)	13 j. (340-280 gr.)	3 mg.	Cal en voie d'ossification ...	D 12,53 G 11,74	4,56 3,48	2,74 3,37	72,60 23,10
24 j. (590-520 gr.)	18 j. (520-540 gr.)	3 mg.	Cal solide	D 14,44 G 15,47	3,87 3,77	3,65 4,10	34,01 10,82
12 j. (460-380 gr.)	12 j. (380-400 gr.)	2,5 mg.	Cal conjonctif	D 10,75 G 10,42	3,77 3,30	2,85 3,06	70,04 35,36
10 j. (800-680 gr.)	24 j. (680-500 gr.)	2 mg.	Cal en voie d'ossification ...	D 12,67 G 13,09	3,73 3,22	3,39 4,06	52,06 5,66
10 j. (750-700 gr.)	24 j. (700-530 gr.)	1 mg.	Cal en voie d'ossification ...	D 11,58 G 13,75	3,75 3,76	3,05 3,39	40,24 6,92
12 j. (300-250 gr.)	18 j. (250-300 gr.)	1 mg.	Cal en cours d'ossification ..	D 13,20 G 10,87	3,68 3,55	3,58 3,22	72,20 3,58
12 j. (440-400 gr.)	18 j. (400-400 gr.)	0,15 mg.	Cal conjonctif gros œdème du foyer	D 10,87 G 13,09	3,41 3,53	3,46 4,03	— 11,34

2. ANIMAUX FRACTURÉS CARENCÉS OU NON EN VITAMINE C
ET TRAITÉS PAR L'ACIDE ASCORBIQUE.

La contre-épreuve des expériences précédentes devait nécessairement consister en l'administration d'acide ascorbique à des animaux fracturés en période de carence ou en dehors de celle-ci et d'observer les effets de la vitamine sur la réparation osseuse. Nous l'avons réalisée dans les quatre expériences suivantes où les animaux ont reçu des doses diverses, inférieures, égales ou supérieures à celles couvrant leur besoin quotidien (5 mg.) en acide ascorbique :

a) Six Cobayes ont été soumis au régime scorbutigène pendant 10, 14 et 24 jours, puis fracturés et on a administré dès le lendemain du traumatisme :

— 3 mg. par jour d'acide ascorbique pendant 13 à 18 jours à quatre d'entre eux.

— 2 mg. par jour d'acide ascorbique pendant 24 jours à un Cobaye.

— 1 mg. par jour d'acide ascorbique pendant 24 jours à un Cobaye.

b) Quatre Cobayes ont été fracturés et mis au régime scorbutigène pendant 12 jours, puis ont reçu des doses quotidiennes croissantes d'acide ascorbique, soit 0 mg.,¹⁵ — 1 mg. — 2 mg.,⁵ — 5 mg. pendant 18 jours. Les résultats obtenus sur ces deux premiers lots ont été réunis dans le tableau XIII.

c) Dans une troisième expérience, trois Cobayes ont été soumis au régime scorbutigène dès leur fracture ; nous avons ensuite donné à chaque animal une dose journalière de 0 mg.,⁵ d'acide ascorbique pendant 11 jours, puis 10 mg. du même corps pendant 169, 25, 30 jours. Les données établies sur les animaux figurent au tableau XIV.

d) Enfin, et pour être absolument certain du rôle de la vitamine C dans la consolidation des fractures, nous avons fracturé trois Cobayes auxquels nous avons donné un régime dépourvu de facteur C et auxquels nous avons administré chaque jour, pendant 20, 26, 30 jours, une dose de 5 mg. d'acide ascorbique. On trouvera nos observations dans le tableau XV.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus *témoignent d'une action nette de l'acide ascorbique, même à dose très faible, et par ailleurs, ils indiquent que la vitamine intervient d'une ma-*

nière d'autant plus efficace que la dose administrée se rapproche plus de celle exigée par l'animal pour la couverture du besoin normal (5 mg.). Il ne semble pas qu'une dose double ait à cet égard un effet plus favorable.

TABLEAU XIV. — *Teneurs en phosphore (P) et en azote (N), rapport P/N et activités phosphatasique des diaphyses radiales de Cobayes adultes ayant le radius droit fracturé, recevant un régime scorbutigène et traités par l'acide ascorbique (0,5 puis 10 mg. par jour) depuis le début de l'expérience.*

Durée des périodes de traitement à diverses doses de vitamine C et variations du poids des animaux		Signes à la dissection	P p. 100	N p. 100	P/N	Acti- vité phos- phata- sique
0,5 mg. p. jour	10 mg. par jour					
0 j. (650-520 g.)	20 j. (520-510 g.)	Cal conjonctif, grande activité périostique.	D 10,14 G 13,74	3,83 3,98	2,64 3,45	79,79 27,22
0 j. (600-460 g.)	26 j. (460-490 g.)	Cal en voie d'ossifica- tion	D 12,20 G 13,18	3,98 4,21	3,07 3,10	48,00 11,74
0 j. (850-650 g.)	30 j. (650-500 g.)	Consolidation com- plète	D 12,68 G 13,11	3,65 3,39	3,47 3,86	— 7,78

TABLEAU XV. — *Teneurs en phosphore (P) et en azote (N), rap-
port : P/N et activité phosphatasique des diaphyses radiales
de Cobayes à radius droit fracturé soumis à un régime scor-
butique et recevant 5 mg. d'acide ascorbique par jour.*

Durée de l'expé- rience et variations du poids des animaux	Signes à la dissection	P p. 100	N p. 100	P/N	Acti- vité phos- phata- sique
20 j. (470-350 g.)	Cal conjonctif, forte activité périostique	D 12,94 G 13,12	4,11 3,49	3,14 3,76	43,64 33,89
26 j. (450-400 g.)	Cal osseux.....	D 12,48 G 14,72	4,04 3,57	3,08 4,12	8,65 1,73
30 j. (420-320 g.)	Cal osseux	D 13,93 G 12,48	3,85 3,55	3,61 3,51	7,54 10,66

On observe en effet, après dix à quinze jours de traitement faisant suite à une quinzaine de scorbut un début de réparation avec 1 à 2 mg. de vitamine par jour et une consolidation avec 3 mg., l'évolution de la lésion étant normale chez des animaux au régime scorbutigène additionné quotidiennement de 5 mg. de vitamine. Les tests chimiques et l'observation présentent dans les divers cas étudiés une concordance satisfaisante. En effet, alors que le scorbut empêche la formation du cal, l'administration d'acide ascorbique aux animaux recevant un régime scorbutigène permet la formation d'un tissu cicatriciel très riche en phosphatase pendant la période initiale de son ossification, puis la calcification de celui-ci, dont les caractères chimiques sont identiques à ceux des cals normaux.

D. DISCUSSION DES RÉSULTATS.

L'ensemble des données qui viennent d'être exposées, met en lumière un certain nombre de faits qu'il convient de dégager. La discussion de ceux-ci permettra par la suite de tirer les conclusions de notre travail. Les documents établis sont relatifs — en dehors des données portant sur des animaux témoins normaux fracturés ou non — d'une part à l'ossification chez des animaux scorbutiques, et, d'autre part, à l'action de la vitamine C chez des Cobayes carencés ou non en celle-ci. Tous apportent par ailleurs, une contribution à l'étude biochimique des processus d'ossification.

I. — *Troubles osseux chez les scorbutiques. Réparation des fractures dans la carence en vitamine C.*

Il est actuellement certain, contrairement à une opinion trop longtemps admise, que les os ne constituent pas des organes de soutien inertes, mais sont au contraire le siège de remaniements incessants de leurs sels, lesquels forment une réserve minérale facilement mobilisable pour des besoins généraux (équilibre acide-base) ou particuliers (régulation de la calcémie). Les expériences de VON HEVESY [30], ayant permis de suivre la fixation et la mise en liberté d'atomes de phosphore radioactifs dans les os et les dents, ont fourni à cet égard des observations significatives.

En toutes circonstances où le renouvellement des humeurs osseuses s'opère à un rythme accéléré, chaque fois que la circulation sanguine augmenté dans une région osseuse, on note un appauvrissement de l'os en sels. Les déminéralisations osseuses expérimentales ou pathologiques ont lieu avec une extrême facilité sous l'influence des causes les plus diverses, dont JUNG [36] a récemment essayé de dresser un bilan. Mais ces déminéralisations ne vont en général pas de pair avec une disparition importante du support protéique des sels ; elles se traduisent, de ce fait même, par une diminution du rapport : P/N.

Il en va tout autrement dans le scorbut. La fragilité osseuse des animaux carencés connue depuis longtemps, la réduction de masse des os, bien étudiée par DJABRI, permettaient de penser que la carence allait de pair avec une résorption *totale* de substance osseuse. MOURIQUAND, LEULIER et MICHEL [52], DJABRI [7] avaient déjà observé que le rapport : Ca/P demeurait alors normal, ce qui traduit l'intégrité des « sels de l'os ». De même, la teneur en cendres des os n'est pas fortement abaissée comme elle l'est chez les rachitiques, par exemple. Or, nous constatons que l'indice de calcification que constitue le rapport : P/N ne présente qu'un léger abaissement au cours de l'évolution du scorbut et jusqu'à la fin de celle-ci (voir tableau IV). L'ensemble des données établies par les auteurs antérieurs et par nous-mêmes, démontrent donc que *les os subissent au cours de la carence en vitamine C non pas tant une déminéralisation qu'une perte de substance. Leur fragilité est due à une réduction de masse et non à un ramolissement.*

Les lésions osseuses du scorbut présentent donc un caractère particulier, lequel devait nécessairement attirer l'attention des chercheurs sur le stroma protéique des pièces squelettiques.

Si les os des scorbutiques présentent une perte de substance osseuse totale, avec disparition de la partie protéique de celle-ci, on peut penser que l'organisation du stroma conjonctif du cal doit être gênée par la carence en vitamine C chez les animaux fracturés. C'est bien là ce que l'expérience a vérifié. En effet, des animaux fracturés soumis à un régime complet, consolident leurs lésions en 25 jours environ dans les conditions où nous nous sommes placés, tandis qu'il n'en est

pas de même, chez ceux soumis à un régime scorbutigène. Ces derniers ne présentent alors qu'une ébauche très imparfaite de cal et, la plupart du temps, leur autopsie révèle même une absence totale de tissu cicatriciel entre les fragments osseux. Toutefois les animaux sacrifiés au bout de 10 à 15 jours de régime scorbutigène et fracturés au début de la mise à ce régime, présentent en général, un cal fibro-conjonctif : aussi est-il probable que celui-ci se résorbe ultérieurement.

L'étude chimique des os poursuivie parallèlement sur des animaux normaux ou scorbutiques porteurs de fractures ou non, a révélé les divers faits suivants. Chez des Cobayes fracturés à régime normal, on note, comme J. ROCHE et MOURGUE [65] l'avaient déjà observé chez le Rat et le Pigeon, une déminéralisation progressive pendant 15 à 20 jours, puis au moment de la « prise » du cal un enrichissement en sels portant, non seulement sur celui-ci mais sur l'ensemble de la diaphyse fracturée (Tableau V). Le Cobaye ne présente, à cet égard, aucune différence avec le Rat ou le Pigeon.

Les fragments diaphysaires des animaux scorbutiques, sont le siège de phénomènes complexes auxquels participent la déminéralisation habituelle aux extrémités fracturées, la résorption osseuse de la carence. Ce dernier phénomène est beaucoup plus intense que le premier, sur lequel il a en quelque sorte, le pas. Aussi observe-t-on que l'indice de calcification : P/N est plus élevé, plus voisin de sa valeur normale, chez le scorbutique que chez le Cobaye normal (Tableaux V, X). Ce fait, à première vue surprenant, traduit simplement la perte de substance particulièrement grande des extrémités fracturées des scorbutiques. Celles-ci deviennent en effet, extrêmement minces et souvent d'une fragilité analogue à celle des coquilles d'œufs, alors que les extrémités osseuses non sou-dées des animaux normaux, présentant des pseudarthroses fibreuses, demeurent plus solides. Ici encore, l'attention est donc attirée vers la matrice protéique de la substance osseuse, tant au niveau des fragments que dans le processus de réparation.

En dehors des données portant sur la composition des os, nous en avons établies d'autres sur leur activité phosphatasique. On pouvait en effet penser que la phosphatase des os aurait son action modifiée par la carence et que les troubles dus à celle-ci, tiendraient en partie au défaut du ravitaille-

ment local des ions $\text{PO}_4^{\equiv}$, assuré par l'enzyme. Par ailleurs, celui-ci étant sécrété par certains éléments cellulaires du stroma protéique, tout trouble de sa formation pouvait provoquer secondairement une modification de son activité phosphatasique. A la vérité, les observations que nous avons pu faire sur les os des scorbutiques sont d'une interprétation difficile. Dans un grand nombre de cas, les diaphyses osseuses des scorbutiques présentent une activité phosphatasique très supérieure à celle des témoins normaux (Tableaux II et V). Mais il n'en est pas toujours ainsi. Il est donc peu probable qu'une participation importante de la phosphatase aux phénomènes observés doive être envisagée systématiquement. Il semble plutôt que l'augmentation de l'activité enzymatique rencontrée dans un grand nombre de cas, soit secondaire et tienne aux éléments cellulaires dont l'activité aboutit à la résorption osseuse. C'est là, certainement, un phénomène d'une complexité assez grande, car, d'une part, l'ostéolyse va presque toujours de pair avec une augmentation de l'activité phosphatasique et, d'autre part, les éléments responsables de l'ostéoclasie aboutissant à la résorption osseuse peuvent apporter des quantités plus ou moins grandes de phosphatase.

Quant au taux de celle-ci dans les os des animaux scorbutiques fracturés, elle présente une augmentation importante, mais du même ordre que celle notée chez les témoins (Tableaux V et X). En somme, les résultats apportés par cette deuxième catégorie de recherches ne permettent pas de conclusions précises en ce qui concerne l'intensité des processus de résorption osseuse chez les scorbutiques.

II. — *Action de l'acide ascorbique sur la réparation des fractures.*

L'administration d'acide ascorbique exerce systématiquement une action favorable sur l'évolution des fractures chez le Cobaye carencé ; il est sans action nette sur le Cobaye soumis à un régime alimentaire normal. Les modalités suivant lesquelles la vitamine C exerce son activité sont intéressantes à préciser, car c'est d'elles que vont découler les conséquences thérapeutiques de notre travail.

Le besoin quotidien du Cobaye en acide ascorbique est voisin de 5 mg. Des animaux recevant un régime scorbutigène,

et chaque jour 5 mg. de vitamine C, consolident leur fracture de manière satisfaisante, aussi bien en ce qui concerne le temps de réparation, que l'indice chimique de calcification de leur cal (Tableau XV). Si le même régime est additionné de quantités d'acide ascorbique notablement inférieures à celle-ci, telles que 1 milligramme par jour, et même 0 mg.,5, la réparation des fractures bien que plus lente, s'observe encore (Tableaux XIV, XV). Par contre, aucun bénéfice n'est obtenu en administrant aux animaux une quantité double de celle quotidiennement exigée par la couverture du besoin.

Tout se passe donc, comme si la vitamine C était indispensable à la réparation osseuse, celle-ci utilisant préférentiellement la petite quantité d'acide ascorbique localement exigée. Une fois ce besoin particulier couvert, l'excès de vitamine sert à la couverture des autres besoins, mais n'intervient plus dans l'ossification.

C'est là, très probablement ce qui explique la divergence des résultats cliniques obtenus jusqu'ici (HANKE, SCHILOWZEW, GIANGRASSO, TRÜCK). On s'explique fort bien que certains sujets carencés en acide ascorbique aient tiré grand bénéfice de l'administration de celui-ci, pour réparer leurs fractures, tandis que chez d'autres, non carencés, recevant un régime complet, le même traitement ait été poursuivi sans profit.

III. — *Besoin en acide ascorbique et fractures.*

Nous avons essayé dans des expériences dont nous n'avons pas cru devoir rapporter le détail, de mettre en évidence l'existence possible d'une augmentation du besoin d'acide ascorbique, au cours de la formation du cal. Cette expérience, antérieurement poursuivie par d'autres chercheurs, avait donné entre leur mains, des résultats contradictoires que nous nous expliquons bien ayant constaté, grâce à nos propres essais, qu'elle est irréalisable dans des conditions correctes. En effet, certaines espèces animales, comme le Cobaye, ont physiologiquement un besoin élevé d'acide ascorbique. Or, lorsqu'on administre successivement pendant plusieurs jours, par voie sous cutanée, des doses quotidiennes de 10 (50 mg.) à 20 (100 mg.) fois plus élevées que celles correspondant à leur besoin, les animaux n'éliminent pas le surplus de vitamine, mais le dégradent presque en totalité. Ceux dont le besoin est relative-

ment moindre, ou ceux auxquels la vitamine C n'est pas nécessaire, éliminent bien par le rein *une partie notable de l'excès* de l'acide ascorbique administré (1).

a) Chez l'Homme, la ration quotidienne d'acide ascorbique qu'il convient d'ingérer est voisine de 50 mg. Chez un sujet recevant une alimentation complète, l'ingestion quotidienne de 200 à 300 mg. d'acide ascorbique est suivie de l'excrétion urinaire de quantités progressives de ce corps, atteignant de 30 à 50 mg. La plus grande partie de l'excès fourni à l'organisme, n'est donc pas rejetée mais disparaît même une fois atteint ce que divers auteurs, estiment être la « saturation » (2) des tissus.

Un certain nombre de sujets, soit normaux, soit présentant une fracture récente, ont reçu 200 mg. par jour d'acide ascorbique. Si l'on tient compte des quantités de vitamine présentes dans l'urine de chacun au début de l'observation, quantités permettant d'apprécier grossièrement l'état, normal — précaire ou carencé — du sujet, il n'existe aucune différence entre les sujets normaux et les sujets fracturés en ce qui concerne la rétention de la vitamine C administrée.

b) Chez le Rat, animal faisant la synthèse de l'acide ascorbique, il n'existe pas de besoin en celui-ci. Or, l'administration quotidienne par injection sous cutanée de 50 mg. d'ascorbate de sodium, préparé extemporanément, à deux animaux nous a conduit à observer l'émission urinaire assez régulière d'environ 20 p. 100 du produit administré, 80 p. 100 de celui-ci, ont donc été fixés ou détruits. Nous avons étudié l'excrétion de l'acide ascorbique administré à dose de 50 mg. par jour chez des Rats normaux, puis présentant une fracture du fémur. Dans les deux périodes expérimentales, aucune différence notable n'a été observée après la fracture.

c) Quant aux Cobayes, soumis à un régime complet non scorbutigène, l'ingestion quotidienne de 10 à 100 mg. d'acide ascorbique pendant 5 et 10 jours, n'a été suivie dans un cas

(1) La méthode de dosage que nous avons employée, à cet effet, est celle de EMMERIE et VAN EEKELEN modifiée et appliquée au dosage de l'acide ascorbique dans l'urine par MANCEAU, POLIGARD et FERRAND [43].

(2) Le terme de saturation, prête malheureusement à confusion, car l'émission de l'excès d'acide ascorbique, observé dans les conditions que nous venons de préciser traduit beaucoup plus le fait que le mécanisme d'oxydation de la vitamine C par l'organisme est débordé, plutôt que la saturation des tissus en celle-ci.

comme dans l'autre, d'aucune élimination supérieure à 10 p. 100 de la vitamine C administrée. L'injection d'acide ascorbique (10,50 et 100 mg.) pendant 2, 4 et 6 jours ne provoque qu'une excrétion de vitamine légèrement plus forte.

Ces expériences ne permettent donc aucune conclusion, en ce qui concerne le besoin en vitamine C chez des animaux fracturés, mais elles permettent d'affirmer que les déductions affirmatives ou négatives LAUBER-NAFZIGER, BERSIN [37], TRÜCK [70], formulées à ce sujet par différents auteurs, à la suite d'essais du même type, ne méritent pas d'être retenues.

IV. — *Mécanisme d'action de l'acide ascorbique dans les processus d'ossification. Biochimie générale des réparations osseuses.*

Les expériences que nous venons de discuter, rendent compte de l'extrême importance de la vitamine C dans la vie du squelette et dans la réparation de ses fractures. Dès lors, il y avait lieu de se demander comment l'acide ascorbique exerce son action. Comme on l'a vu, divers faits orientent l'attention vers son rôle dans la genèse et le maintien du stroma protéique de la substance osseuse. Or, de nombreux travaux histologiques permettent de considérer la vitamine C, comme indispensable à la formation du tissu conjonctif (WOLBACH et HOWE [73], JENER et KORPASSY [35], MAZOUÉ et RANDOIN [47]). Nous avons pensé que cette action pouvait avoir un facteur local important au niveau du foyer de fracture et que, de ce fait, on pouvait espérer mettre en évidence dans celui-ci, une accumulation d'acide ascorbique, à certaines phases de son évolution. Nous avons été orientés vers cette idée, par l'observation (Tableau III) que des régions osseuses ou dentaires en voie de développement sont plus riches en vitamine C que les autres. C'est ainsi que, par exemple, la racine des incisives du Cobaye contient plus d'acide ascorbique que la pointe, et que chez les animaux jeunes, les épiphyses osseuses des os longs en renferment plus que les régions médianes diaphysaires.

Comme l'indiquent les valeurs rassemblées dans les tableaux VII et VIII, le taux d'acide ascorbique du foyer de fracture devient très rapidement beaucoup plus élevé que celui des extrémités osseuses, et du tissu avoisinant (muscle) aux dé-

pens duquel il se forme. Il s'enrichit progressivement en vitamine, le taux de celle-ci passant par un maximum vers le 12^e jour de l'expérience pour décroître et atteindre vers le 20^e jour, une valeur identique à celle existant dans l'os. Or, c'est dans les 12 premiers jours après la lésion que se forme le cal conjonctif lequel est complètement constitué et commence à donner naissance à de la substance préosseuse vers le 15^e jour.

L'accumulation d'acide ascorbique au niveau du cal, se manifestant si nettement dans nos expériences, s'opère donc uniquement pendant la période où le cal conjonctif se forme ; nous considérons dès lors comme probable, sa participation à ce phénomène.

C'est là un fait que nous explique une autre observation que nous avons pu faire, à savoir que des Cobayes ayant subi un régime normal pendant les quinze premiers jours consécutifs à leur fracture, puis mis au régime scorbutigène, réparent à peu près normalement leurs lésions (Tableau XII) tandis que ceux qui ont été placés pendant quinze jours à un régime scorbutigène, puis sont soumis par la suite à un régime normal, présentent un retard de consolidation important (Tableau XI). Ce fait trouve son explication dans l'interprétation que nous venons de développer, car il traduit simplement la possibilité d'organisation du cal conjonctif chez les premiers dans la première période d'expérience et l'impossibilité du même phénomène chez les seconds pendant la même période. *L'acide ascorbique nous apparaît donc comme intervenant dans la réparation des fractures osseuses pendant la période d'organisation du cal conjonctif. Par contre, sa disparition progressive du cal une fois cette première période terminée, semble bien indiquer qu'il ne participe pas aux phénomènes dont le foyer de fracture est par la suite le siège.*

Une fois le cal conjonctif formé, il subit une transformation qui aboutit à la genèse d'un tissu apte à se calcifier, puis il se calcifie. La nature de cette transformation demeure inconnue, tant au niveau d'un foyer de fracture que dans une pièce squelettique normale en développement. Les histologistes, qui seuls ont pu l'étudier jusqu'ici, en suivent l'évolution par la mise en évidence de modifications de l'affinité de la substance préosseuse pour divers colorants.

Il semble que, comme l'a bien vu ROBISON [58], l'apparition et l'augmentation de l'activité phosphatasique en soient des manifestations biochimiques. C'est, en nous basant sur cette conception que nous avons voulu étudier parallèlement les modifications de la teneur en vitamine C du cal en cours d'évolution et celles de son activité phosphatasique. Celle-ci ne se manifeste que tardivement. En effet, pendant toute la période de formation du cal conjonctif, elle demeure pratiquement nulle ; ce n'est qu'au delà du 15^e jour, c'est-à-dire, dans la période où la teneur en vitamine C du cal diminue, qu'elle augmente (Tableaux XI et XII). Elle augmente alors très rapidement pour atteindre un maximum environ 20 jours après la fracture. Ainsi donc, *formation du cal conjonctif et accumulation d'acide ascorbique dans celui-ci d'une part, transformation du cal conjonctif en substance préosseuse et enrichissement en phosphatase d'autre part, sont des phénomènes successifs, caractérisant chacun une phase particulière de l'évolution du cal.*

L'activité phosphatasique atteint rapidement, en quelques jours, son maximum, et par la suite, elle diminue de manière presque aussi rapide. Or, l'accumulation des sels dans le cal et la « prise » de celui-ci, présentent de leur côté, une évolution qu'il importe de mettre en parallèle avec celle de l'activité phosphatasique, pour bien comprendre le rôle de celle-ci dans la formation de la substance osseuse. Pendant la période où l'activité phosphatasique croît de manière importante, la teneur en sels du cal augmente, sans que les tissus s'ossifient. Comme l'ont observé J. ROCHE et MOURGUE [64], les tissus s'enrichissent alors en cendres de manière importante, mais le rapport : P/Ca présente une valeur notablement inférieure à celle correspondant au phosphate tricalcique ou aux apatites de la substance osseuse. Dans cette période les éléments minéraux renferment un excès important de phosphore qui s'accumule grâce au mécanisme local d'approvisionnement en ions phosphoriques que constitue la phosphatase. Ce n'est que, lorsqu'une charge non négligeable (pouvant atteindre 20 p. 100 dans les expériences de J. ROCHE et MOURGUE) de sels s'est accumulée dans le cal, et quand un excès important d'ions phosphoriques a été fixé par celui-ci, qu'une précipitation de phosphate tricalcique a lieu ; on observe alors la « prise » du cal. Aussi, n'est-il pas surprenant

que la phosphatase exerce son activité principalement avant cette dernière période de l'ossification.

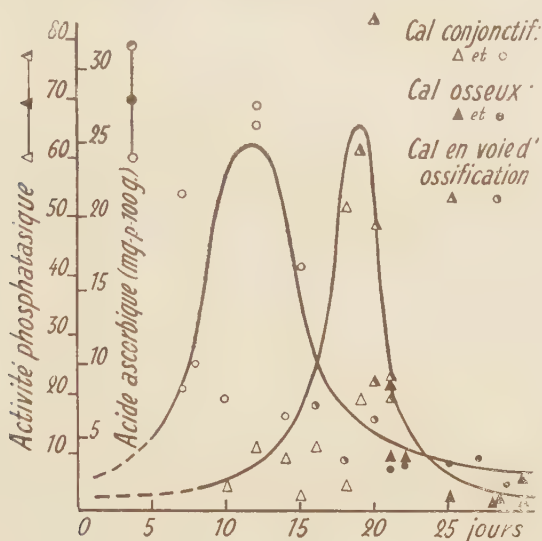


FIGURE 1. — Variations de la teneur en acide ascorbique et de l'activité phosphatasique du cal en fonction du temps écoulé depuis la fracture du radius chez le Cobaye.

Abscisses : nombre de jours après la fracture.

Ordonnées : Activité phosphatasique (unités). Teneur en acide ascorbique (mg. p. 100 g.).

Ces faits sont objectivés par les courbes représentées sur la figure 1 ci-dessus, établies à partir de nos données expérimentales (1).

Ainsi se trouvent séparées et caractérisées, chacune par un phénomène chimique particulier, les trois périodes de la formation d'un cal, et probablement aussi de la substance osseuse dans les pièces squelettiques en voie de formation :

1. La première est constituée par l'organisation d'une matrice conjonctive ; elle est régie par l'acide ascorbique.

2. La seconde est la transformation du cal conjonctif en substance préosseuse ; temps préparatoire à la calcification,

(1) Les activités phosphatasiques des animaux fracturés recevant un régime complet additionné ou non d'1 ou 5 mg. p. jour d'acide ascorbique nous ont paru pouvoir être rassemblés dans une même figure, car la vitamine administrée dans ces conditions est sans grande influence sur la vitesse de consolidation.

elle comporte l'apparition de la phosphatase et le stockage des ions phosphoriques libérés par l'action de celle-ci.

3. La troisième est la « prise » de sels minéraux sur un stroma protéique tenant ces propriétés particulières de son évolution antérieure.

V. — *Conséquences thérapeutiques.*

En dehors de leur intérêt biochimique, nos observations comportent des conséquences thérapeutiques qui permettent à Monsieur le Professeur agrégé J. DOR de poursuivre des essais de thérapeutique médicale des fractures. Nous avons rappelé plus haut les résultats divers obtenus antérieurement à nous, au cours d'essais poursuivis dans le même but. Il est clair que l'on ne saurait attendre de la thérapeutique par l'acide ascorbique la même action quelles que soient les conditions dans lesquelles la vitamine C est administrée. Puisque l'acide ascorbique exerce son action sur la réparation des fractures même lorsque les quantités administrées sont inférieures à celles correspondant au besoin minimum, seuls les sujets recevant un régime notoirement insuffisant en acide ascorbique pourront tirer bénéfice de l'administration de ce corps. Il est donc logique que la thérapeutique faite jusqu'ici sans aucune contrôle de l'état des sujets en ce qui concerne l'existence ou la non-existence de carence ou de pré-carence ait donné des résultats anarchiques. La première condition pour que l'acide ascorbique exerce une action favorable, est de l'administrer à des sujets dont le régime alimentaire en est trop pauvre : population des villes et des campagnes en période hivernale, population des villes en dehors des époques où les légumes (chou, tomate, pommes de terre) et les condiments (persil) riches en acide ascorbique, les fruits acides (orange, citron, baies, pommes) sont abondants, collectivités dont l'alimentation est dépourvue des aliments apportant habituellement l'acide ascorbique.

Par ailleurs, puisque la vitamine C n'intervient que sur la formation du cal conjonctif, son usage thérapeutique devra nécessairement être précoce et elle devra être administrée la première quinzaine après l'accident. Le traitement sera par contre sans objet ni efficacité postérieurement, car il n'exercera aucune influence ni sur la formation de la substance

préosseuse ni sur la calcification proprement dite. Celle-ci, tirera par contre bénéfice de l'administration de la vitamine D comme l'ont montré expérimentalement J. ROCHE et MOURGUE [65].

Telles sont les déductions thérapeutiques de nos expériences sur lesquelles Monsieur le Professeur DOR a basé l'expérimentation clinique qu'il poursuit depuis l'hiver de l'année 1940-1941 et dont les premiers résultats, basés sur environ trente observations peuvent être considérés comme encourageants.

CONCLUSIONS.

Les recherches que nous avons entreprises sur le rôle de la vitamine C dans la réparation des fractures osseuses ont comporté un ensemble d'expériences sur la composition et l'activité phosphatasique des os chez le Cobaye normal, au cours de l'évolution du scorbut et pendant la formation du cal, chez des animaux normaux ou scorbutiques. Leurs résultats peuvent être résumés ainsi :

I. Contrairement à ce que l'on observe chez le Rat, les diaphyses des os longs du Cobaye présentent même dès le jeune âge (50-100 grammes) un degré de minéralisation pratiquement identique à celui existant chez l'adulte. Il en résulte que l'on peut établir au moyen du rapport : P/N , l'existence de déminéralisations osseuses chez le Cobaye sans que des différences de taille gênent l'interprétation des résultats.

II. Pendant le scorbut expérimental, la composition et le degré de minéralisation des os s'abaisse légèrement, l'activité phosphatasique n'étant par ailleurs qu'irrégulièrement augmentée. Mais on observe alors une perte de substance osseuse. *Le scorbut comporte une résorption osseuse beaucoup plus qu'une déminéralisation.* Chez l'animal carencé en vitamine C il y a perte de substance osseuse par les pièces squelettiques et non appauvrissement en sels de celles-ci.

III. Chez le Cobaye normal l'évolution des fractures va de pair avec, à son début, une phase de déminéralisation générale du squelette identique à celle observée par ROCHE et MOURGUE sur d'autres espèces et désignée par LERICHE sous le nom de « maladie biologique des fracturés ». Au niveau de l'os porteur de la lésion (radius soutenu par le cubitus formant attelle) on observe d'abord une déminéralisation des fragments, puis une reminéralisation de ceux-ci dans la période de consolidation.

IV. Les os et les dents des animaux normaux sont très pauvres en acide ascorbique, les régions en croissance contenant toutefois plus de vitamine C que les autres. Chez les animaux fracturés recevant un régime complet additionné ou non de petites quantités d'acide ascorbique *le cal s'enrichit en vitamine dans la première période de sa formation* (cal conjonctif). *Sa teneur en vitamine C atteint un maximum bien avant qu'il devienne riche en phosphatase* et, lorsque cet enzyme manifeste une grande activité, le cal est redevenu très pauvre en acide ascorbique. Cette évolution présente une amplitude particulièrement grande dans le cal, mais on la retrouve au niveau des pièces osseuses intactes. Elle fait partie des « réactions générales du squelette » dont il a déjà été question.

V. L'activité phosphatasique du cal, très minime lors de la formation de la matrice conjonctive de celui-ci, devient brusquement intense dans la période qui précède immédiatement sa « prise » ; elle redevient pratiquement nulle quand le cal est solidifié. L'apparition et la disparition d'une activité phosphatasique intense s'opèrent en quelques jours, le maximum de pouvoir phosphoestérasique étant observé avant ou au début de la « prise » du cal. C'est là un fait analogue à ceux signalés par ROCHE et FILIPPI au sujet de l'intervention de la phosphatase dans la croissance osseuse, par ROCHE et BULLINGER sur l'évolution de la teneur des dents en le même enzyme au cours de leur développement. *La phosphatase apparaît dans tous ces cas comme participant à une phase préparatoire à la calcification* et non, comme le prévoit la théorie de ROBISON, à la formation directe du « sel de l'os ».

VI. L'ensemble des observations que nous venons de résumer sur l'évolution des teneurs en phosphatase et en vitamine C du cal au cours de son évolution indiquent que *ces deux corps interviennent chacun dans une période particulière de la réparation osseuse. La vitamine joue un rôle dans la formation du cal conjonctif, tandis que l'enzyme ne participe qu'à la transformation de celui-ci en cal ossifiable*, en favorisant la formation à son niveau d'ions phosphoriques permettant l'apparition brusque de phosphate tricalcique au moment de la « prise ».

VII. *L'administration à des Cobayes fracturés d'un régime scorbutigène rend pratiquement impossible la réparation des*

lésions osseuses de manière satisfaisante. Dans un grand nombre de cas, l'ébauche de cal conjonctif formée initialement se résorbe et les extrémités osseuses demeurent libres. Elles ne sont pas alors sujettes à une forte déminéralisation comme chez les témoins, mais à une perte de substance osseuse (matrice protéique et sels), comme les os intacts des scorbutiques.

VIII. L'administration d'un régime scorbutigène complété par de l'acide ascorbique, même en quantité insuffisante pour couvrir le besoin global du Cobaye en ce corps, permet la réparation des fractures. De même, celle-ci s'opère normalement chez des animaux soumis à un régime scorbutigène après que le cal conjonctif a pu se former, tandis qu'elle est retardée par l'administration d'un régime scorbutigène pendant les premiers jours qui suivent la lésion osseuse.

IX. *L'ensemble de ces faits permet de considérer la vitamine C comme jouant un rôle de premier plan dans les réparations osseuses, grâce à son action sur la formation du tissu conjonctif du cal.* Ils permettent de poser les principes d'une thérapeutique médicale des fractures, dont l'application est actuellement en cours.

Marseille, le 2 juin 1941. Vu et approuvé :

Le Président,
JEAN ROCHE.

Vu et approuvé :

Le Doyen,
LUCIEN CORNIL.

Vu et permis d'imprimer. Aix, le 9 juin 1941.

Le Recteur,
PIERRE MARTINO.

BIBLIOGRAPHIE.

1. BELTRAMI (G.). — Le déséquilibre alimentaire (carence C) dans les troubles du métabolisme calcaire (ossification et dentition) en pathologie humaine et comparée. *Marseille Méd.*, 1938, **75**, n° 17, 1-35.
2. BEZSSONOFF (N.) et WOLOSZYN (M.). — Sur les phénomènes qui accompagnent l'oxydation de la vitamine C. *C. R. Soc. biol.*, 1936, **122**, 941. — Les particularités de l'oxydation réversible de la vitamine C démontrées par l'épreuve sur le Cobaye. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **112**, 944. — L'excrétion de la vitamine C et de ses dérivés par le Cobaye traité par l'acide ascorbique à doses massives. *Arch. Phys. biol.*, 1941, **15**, N° 47, 4-7.
3. BEZSSONOFF (N.), ROHMER (P.) et STOERR (E.). — La teneur en vitamine C du sang et des urines après injection massive. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 1090.
4. COHEN (B.) and MENDEL (L. B.). — Experimental scurvy of the guinea pig in relation to the diet. *Journ. of biol. Chem.*, 1918, **35**, 425-453.
5. CRÉTIN (A.). — Recherches sur l'ossification et sur la réparation des fractures, 1 vol., 351 p., Imprimerie Instit. Comm., éd., Le Mans, 1925.
6. DELF (E. M.) and TOZER (F. M.). — The antiscorbutic value of cabbage. The antiscorbutic and growth promoting properties of raw and heated cabbage on the histological diagnosis of experimental scurvy. *Biochem. Journ.*, 1918, **12**, 416-447.
7. DJABRI (A.). — Effet de l'acide ascorbique sur l'ostéogénèse et la minéralisation des os de cobaye normal et scorbutique. *Ztschr. f. Vitaminforsch.*, 1940, **10**, 210-224.
8. DUMAZERT (C.) et MARCELET (Y.). — Sur un nouveau catalyseur de minéralisation en vue du dosage de l'azote par la méthode de KJELDAHL. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 201-216.
9. DUMAZERT (C.) et MOURGUE (M.). — Submicrodosage de l'ion phosphorique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 1151-1163.
10. EEKELEN (van M.). — On the amount of ascorbic acid in blood and urine. The daily human requirement for ascorbic acid. *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, 2291-2298.
11. ETTORI (J.) et GRANGAUD (R.). — Phénomènes d'auto-oxydation et de catalyse inorganique dans les conditions d'activité de l'oxydase de l'acide ascorbique. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 557.
12. FILIPPI (A.). — Recherches sur la participation d'une phosphatase à la calcification des os longs et à la réparation de leurs fractures. *Thèse Doct. Pharm.* Marseille, 1 vol., 114 p., Patissier édit., Trévoux, 1938.

13. FISH (E. W.) et HARRIS (L. J.). — The effects of Vitamin C deficiency on tooth structure in guinea pigs. *Phil. Trans. Roy. Soc., London*, 1934, **223**, 489-510.
14. FRÄNKEL et ISRAËL. — Recherches sur l'influence de l'avitaminose sur la guérison des fractures des os. *Klin. Wochenschr.*, 1926, **94**, cité d'après [41].
15. GATET (L.), GENEVOIS (L.) et MANDILLON (G.). — L'acide ascorbique dans les divers organes du Cobaye dosé par précipitation de la dinitrophénylhydrazone. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 1036.
16. GENEVOIS (L.) et SAG (G.) et ESPIL (L.). — Quelques dosages de l'acide ascorbique dans les produits végétaux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1940, **22**, 311-314.
17. GIANGRASSO (G.) e GARGITANO (L.). — Le iperdosi di vitamina C nelle fratture sperimentali. *Boll. Soc. ital. di Biol. speriment.*, 1939, **14**, 531.
18. GIANGRASSO (G.). — Azione acceleratrice della Vitamina C sul processo di guarigione delle fratture. *Policlinico*, 1938, **45**, 2279-2293.
19. GIANGRASSO (G.). — Vitamina C e guarigione delle fratture. *Boll. Soc. ital. Biol. speriment.*, 1938, **13**, 153. — Paratiroïde Vitamina C e fratture sperimentali. *Boll. Soc. ital. Biol. speriment.*, 1939, **14**, 525-527. — Fratturi sperimentali e Vitamina C e D. *Boll. Soc. ital. Biol. speriment.*, 1939, **14**, 522-524. — Sistema reticulo-istiocitario e Vitamina C nelle fratture sperimentali. *Boll. Soc. ital. Biol. speriment.*, 1939, **14**, 528-533.
20. GIROUD (A.). — Rapport sur le rôle des vitamines dans les processus de cicatrizations. Rôle de l'acide ascorbique. (Présenté au comité spécialisé pour l'étude des problèmes de la cicatrisation du Centre National de la Recherche Scientifique le 6 avril 1940).
21. GIROUD (A.). — Acide ascorbique (vitamine C ou facteur anticorbutique), p. 334, in *Traité de Physiologie normale et pathologique*, **12**, 1 vol., Masson et Cie édit., Paris, 1940, 541 p.
22. GIROUD (A.), RATSJAMANGA (A. R.) et LEBLOND (C. P.). — Répartition générale de l'acide ascorbique dans l'organisme et déductions. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 1105-1125.
23. HALÄSZ (Von G.) und MARX (J.). — Ist die Callusbildung durch Zuführung von C Vitamin beeinflussbar ? *Arch. Klin. Chirurg.*, 1931, **169**, 120-131.
24. HANKE (H.). — Vitamin C und Schilddrüse in ihren Beziehungen zur Knochenregeneration. *Klin. Woch.*, 1936, **15**, 1121-1124.
25. HANKE (H.). — Ueber Knochenregeneration und Vitamin A. *Dtsch. zf. Chir.*, 1936, **245**, 530. Analyse in *Klin. Woch.*, 1936, **15**, 1052-1053.
26. HANKE (M. T.). — Nutrition et dentition. **1 vol.**, in *Coll. Actual. Scientif. et indust.*, N° 581, Série Nutrition, 76 p., Hermann et C° édit., Paris, 1937.
27. HARRIS (L. J.). — Vitamin C and infection, in : Perspectives in biochemistry. *Cambridge univ. Press*, édit., 1 vol., 361 p., 1937, 328-336.
28. HENNIGER (W.). — Vitamin C in der Kleintierpraxis. *Tierärztliche Rundschau*, 1938, **43**, cité d'après [15].
29. HERTZ. — Studies on the healing of fracture with special re-

- ference to the significance of the vitamin content of the diet. *Analyse in Ztschr. f. Vitaminsforsch.*, 1938, 384.
30. VON HEVESY (G.). — Applications of isotopes in biology. *Journ. of biol. Chem.*, 1939, **127**, 1213-1224.
 31. HÖJER (A.). — The influence of lemon juice on tissue respiration of normal and scorbutic guinea pig. *Skand. Archiv. f. Physiol.*, 1925, **47**, 242-256.
 32. HÖLST (A.) und FRÖHLICH (T.). — Ueber experimentellen Skorbut. *Ztschr. Hyg. Infekt.*, 1912, **72**, 1-120.
 33. HÖLST (A.) and FRÖHLICH (T.). — Experimental studies relating to ship-beriberi and scurvy. *Journ. Hyg.*, 1907, **7**, 634-671.
 34. HUMPHREYS (F. E.) and ZILVA (S. S.). — Metabolism in scurvy III. The adsorption and retention of calcium and phosphorus by guinea pig. *Biochem. Journ.*, 1931, **25**, 578-593.
 35. JENER und KORPASSY. — Verzögerte Heilung der Haut- und Knochenwunden bei Skorbutikern. Erfolgreiche Behandlung mit Ascorbinsäure. *Zbl. Chirurg.*, 1934, **47**, 28-36. (Analyse in *Klin. Wochenschr.*).
 36. JUNG (M. A.). — Le mécanisme de la résorption osseuse. *Rev. Chirurg.*, 1937, **161**, 473-511.
 37. LAUBER (H. J.), NAFZIGER (H.) und BERSIN (T.). — Frakturen und Vitamin C Haushalt. *Klin. Wochenschr.*, 1937, **16**, 1313-1315.
 38. LERICHE (R.). — Physiologie et pathologie du tissu osseux, 1 vol., 455 p., Masson et Cie édit., Paris, 1939.
 39. LERICHE (R.) et JUNG (A.). — Qu'est-ce qu'un cal ? Signification du mot. Problèmes d'origine. *Maladie Biologique des fractures*, *Journ. Chirurg.*, 1940, **55**.
 40. LERICHE (R.) et POLICARD (A.). — Physiologie normale et pathologique de l'os. 1 vol., 229 p., Masson et Cie édit., Paris, 1926.
 41. LEXER (E. W.). — Die Bedeutung der Vitamin C für die Callusbildung und reaktive Gefäßfülle. *Arch. Klin. Chirurg.*, 1939, **195**, 611-625.
 42. LEXER (E. W.). — Der Einfluss der Vitamin C auf die reaktive Gefäßfülle bei der Frakturheilung. *Klin. Woch.*, 1939, **18**, 268-269.
 43. MANCEAU (P.), POLICARD (A.) et FERRAND (M.). — Remarques sur le dosage chimique de l'acide ascorbique. Etude critique des procédés de purification. Application au dosage de l'urine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **18**, 1623-1635.
 44. MAZOUÉ (H.). — Etude histologique du développement des granulomes expérimentaux chez des cobayes scorbutiques. *Arch. Anat. micros.*, 1937, **33**, 129.
 45. MAZOUÉ (H.). — Evolution fibreuse des granulomes expérimentaux et la vitamine C. *C. R. Ass. Anat.*, Marseille, 1937.
 46. MAZOUÉ (H.). — Action de l'acide ascorbique sur la formation des fibres conjonctives. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **26**, 991.
 47. MAZOUÉ (H.) et RANDOIN (L.). — Les réactions du tissu conjonctif au niveau des lésions expérimentales chez des cobayes présentant du scorbut aigu ou chronique. *Ann. Physiol. et Physicochim. biol.*, 1937, 1057.
 48. MEUNIER (P.). — Sur le dosage de l'acide ascorbique dans les tissus par l'indophénol; colorimétrie cinétique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 877-892.
 49. MITOLO (M.). — Vitamine, 1 vol., Rosenberg et Sellier édit., Torino, 1937, 455 p.

50. MOREL (A.), MOURIQUAND (G.), MICHEL (P.) et THÉVENON (L.). — Sur l'absence de troubles électifs du métabolisme du calcium osseux dans le scorbut expérimental. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **85**, 469.
51. MOURIQUAND (G.), DAUVERGNE (M.) et EDEL (V.). — Avitaminose C subaiguë. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 667. — Décalkification irréversible du col fémoral dans l'avitaminose C chronique. *Presse médicale*, 12 mars 1940.
52. MOURIQUAND (G.), LEULIER (A.) et MICHEL (P.). — Dosage du phosphore et du calcium du tissu osseux et dents de Cobayes soumis à l'avitaminose C. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **92**, 269.
53. MOURIQUAND (G.) et MICHEL (P.). — Scorbut expérimental et inanition. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **34**, 735.
54. MOURGUE (M.). — Recherches biochimiques sur les fractures osseuses expérimentales. *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1939, 117 pages. Declume édit., Lons-le-Saunier.
55. PERROCINTO (A.). — Régénération et guérison des blessures. *Bull. Soc. scient. méd.*, 1926, **7**, 587.
56. POLICARD (A.) et ROCHE (J.). — La formation de la substance osseuse. *Ann. Physiol. et Physicochim. biol.*, 1937, **13**, 645-703.
57. RANDOIN (L.) et LOMBA (L.). — Etude du scorbut produit par un régime complet, biochimiquement équilibré et uniquement dépourvu de facteur C. *C. R. Acad. Sc.*, 1923, **178**, 1973.
58. ROBISON (R.). — The significance of phosphoric esters in metabolism, 1 vol., 104 p., *New-York Univ. Press* édit., 1932.
59. ROBISON (R.). — Bone phosphatase, in *Ergebn. d. Enzymforsch.*, 1932, **1**, 1 vol., 375 p., *Akad Verlagsges.*, M.B.A., édit., Leipzig, 280-294.
60. REISS (P.), REISS (C.) et NORDMANN (J.). — Expériences sur les conditions physicochimiques de l'opacification du cristallin. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 464.
61. ROCHE (A.) et GARCIA (I.). — Recherches sur l'ossification. I. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **19**, 1014-1026.
62. ROCHE (A.), ROCHE (J.) et MARCELET (Y.). — Recherches sur l'ossification IV. Ossification des os plats, étapes du développement du squelette et biochimie générale du système osseux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 705-719.
63. ROCHE (J.) et BULLINGER (E.). — Recherches sur l'ossification. VII. La phosphatase du squelette (os, dents, dermatosquelette) chez les poissons osseux ou cartilagineux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 166-184.
64. ROCHE (J.) et FILIPPI (A.). — Recherches sur l'ossification. V. Augmentation de l'activité phosphatasique du squelette après la fracture d'un os et biochimie générale du système osseux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 1147-1165. ROCHE (J.), FILIPPI (A.) et LÉANDRI (A.). — Recherches sur l'ossification. III. La phosphatase des os longs aux diverses étapes de la croissance. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 1314-1324.
65. ROCHE (J.) et MOURGUE (M.). — Recherches sur l'ossification. Modifications générales de la composition des os longs après fracture expérimentale d'une pièce squelettique et unité physiologique du système osseux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 143-165. — Recherches sur l'ossification, VIII. Teneur en phosphore et en calcium des cals de frac-

- ture et biochimie générale de l'ossification. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**.
66. TAUBER (H.). — The interaction of ascorbic acid (Vitamin C) with enzymes. *Ergebn. der Enzymforsch.*, 1938, **7**, 301-315.
67. TEISSIER (G.). — Les lois quantitatives de la croissance. *Ann. Physiol. et Physicochim. biol.*, 1936, **12**, 527-574.
68. TOZER (F. M.). — The effects in the guinea pig of deprivation of vitamin A and of the antiscorbutic factor with special reference to the conditions of the costochondral junctions of the ribs. *Journal Path. Bact.*, 19 , **24**, 306-325.
69. TRINTIGNAC (P.). — Les réactions de l'ossification à diverses influences expérimentales (Eaux minérales, acide ascorbique, transplants, infection, régime carné). *Thèse Doct. Pharm.*, Lyon, 1939, 1 vol., 97 p., Paquet, édit., 10, rue Jarente, Lyon.
70. TRÜCK (W.). — Vitamin C Stoffwechsel bei chirurgischen Erkrankungen, 1938, **7**, 16-24.
71. WEIL (A.) et MOURIQUAND (G.). — Recherches sur le scorbut expérimental. *Journ. Physiol. Pathol. gén.*, 1918, **17**, 849-855.
72. VICTORI-MEDORI (F. de). — Il processo di riparazione delle fratture in seguito all esclusione funzionale di un rene e comportamento della calcemia in rapporto ad intrambe alle condizione patologiche. *Policlinico, Sez. Chirurg.*, 1938, **45**, 297-319.
73. WOLBACH (S. B.) et HOWE (P. R.). — Intercellular substances in experimental scorbut. *Journ. Pathol. and Lab. Med.*, 1926, **1**, 1.
74. ZILVA (S. S.). — Hexuronic acid as the antiscorbutic factor. *Nature*, 1932, **129**, 690.

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages
INTRODUCTION	9
A. — <i>Biochimie de l'acide ascorbique</i>	9
I. — Constitution	9
II. — Propriétés chimiques	10
III. — Méthodes de dosage	12
IV. — Rôle biologique général	14
1. Scorbut et carence en acide ascorbique	14
2. Action métabolique de l'acide ascorbique	16
3. Action sur le développement du tissu conjonctif	19
B. — <i>Acide ascorbique et ossification</i>	20
C. — <i>Acide ascorbique et dentition</i>	23
D. — <i>Acide ascorbique et réparations osseuses</i>	25
E. — <i>Objet du travail</i>	29
RECHERCHES PERSONNELLES	31
A. — <i>Plan général des expériences</i>	31
B. — <i>Techniques</i>	32
I. — Régime et conditions de vie des animaux. Préparation des os	32
II. — Méthodes chimiques	33
a) Dosage de l'activité phosphatasique	33
b) Détermination du Rapport P/N	33
c) Dosage de l'acide ascorbique	34
C. — <i>Marche des expériences et Résultats expérimentaux</i>	35
I. — Etablissement de données sur l'ossification du Cobaye normal.....	35
1. Indice de calcification	35

2. Activités phosphatasiques.....	38
3. Teneur en acide ascorbique des os et des dents de cobayes normaux en croissance et adultes	39
II. — Minéralisation et activité phosphatasique des os longs dans le scorbut en évolution	42
III. — Etude des os des cobayes normaux fracturés	44
1. Animaux non traités.....	47
2. Animaux traités par l'acide ascorbique	49
IV. — Etude des cobayes fracturés scorbutiques traités ou non par l'acide ascorbique	52
1. Animaux non traités.....	53
2. Animaux traités par l'acide ascorbique	58
D. — <i>Discussion des Résultats</i>	60
i. — Troubles osseux chez les scorbutiques. Réparation des fractures dans la carence en vitamine C.....	60
II. — Action de l'acide ascorbique sur la réparation des fractures	63
III. — Besoin en acide ascorbique et fractures	64
IV. — Mécanisme d'action de l'acide ascorbique dans les processus d'ossification. Biochimie générale des réparations osseuses	66
VI. — Conséquences thérapeutiques	70
CONCLUSIONS	73
BIBLIOGRAPHIE	77

